

Vom Fachbereich für Chemie und Pharmazie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

"Herstellung und Untersuchung von biokompatiblen Materialien für medizintechnische Anwendungen"

von Alexander Borck
aus Helmstedt

1. Referent: Herr Prof. Dr. J. Klein.....

2. Referent: Herr Prof. Dr. S. Lang.....

eingereicht am: ...21.03.2005.....

mündliche Prüfung (Disputation) am:....29.08.2005.....

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftliche Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor / die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen:

Bayer G., Borck A., Nagel M.:

Verfahren zum Beschichten von Implantaten mit einer Polysaccharid-Lage
DE 10223310 A1 (2003)

Borck A., Bayer G.:

Beschichtungssysteme für Implantate zur Erhöhung der Gewebeverträglichkeit
DE 10328815 A1 (2003)

Bayer G., Borck A.:

Implantierbare Stimulationselektrode mit einer Beschichtung zur Erhöhung der Gewebeverträglichkeit
DE 10328816 A1 (2005)

Bayer G., Borck A., Nagel M.:

Verfahren zum Beschichten eines Stents mit einer Polysaccharid-Lage sowie dazugehörige Stents
EP 1364664 A1 (2003)

Bayer G., Nagel M., Borck A.:

Method of coating a stent with a polysaccharid layer and associated stents
US 2004009160SA1 (2004)

Bayer G., Borck A., Nagel M.:

Stent comprising a covalently bonded monolayer
WO 03/099348 A1 (2003)

Borck A., Bayer G.:

Coating systems for implants for increasing tissue compatibility
WO 2004/112857 A1 (2004)

Bayer G., Borck A.:

Implantable stimulation electrode with a coating for increasing tissue compatibility
WO 2004/112891 A1 (2004)

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	I
----------------------------------	----------

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	V
-------------------------------------	----------

1	<u>Einleitung</u>	1
----------	--------------------------	----------

1.1	Allgemeine Einleitung	1
-----	-----------------------	---

1.2	Einführung in die Zielsetzung und Anspruch der Arbeit	4
-----	---	---

1.3	Motivation für die Entwicklung eines DDS im koronaren Bereich	7
-----	---	---

2	<u>Theoretischer Teil</u>	9
----------	----------------------------------	----------

2.1	Polymere Netzwerke	9
-----	--------------------	---

2.1.1	Ionothrope Gelbildung	12
-------	-----------------------	----

2.1.1.1	Alginate	12
---------	----------	----

2.1.1.2	Chitosan	13
---------	----------	----

2.1.1.3	Symplexe Gelbildung Alginate-Chitosan	14
---------	---------------------------------------	----

2.1.2	Kovalent vernetzte, polymere Netzwerke	15
-------	--	----

2.1.2.1	Vernetzung durch niedermolekulare Verbindungen	16
---------	--	----

2.1.2.2	Vernetzung von Polyethylenglykol mit Hexamethyldiisocyanat (HMDI)	16
---------	---	----

2.1.2.3	Kovalente Vernetzung von Hyaluronsäure durch niedermolekulare, divalente Verbindungen	17
---------	---	----

2.1.2.3.1	Vernetzung mit Glutaraldehyd	17
-----------	------------------------------	----

2.1.2.3.2	Vernetzung mit Divinylsulfon	18
-----------	------------------------------	----

2.1.2.3.3	Vernetzung mit Dicycidylether (Diepoxiden)	18
-----------	--	----

2.1.2.3.4	Vernetzung mit Epichlorhydrin	19
-----------	-------------------------------	----

2.1.2.4	Polymeranaloge Reaktionen zur Funktionalisierung des Präpolymers	20
---------	--	----

2.1.2.4.1	Derivatisierung mit Methacrylsäureanhydrid	20
-----------	--	----

2.1.2.4.2	Derivatisierung mit Itakonsäureanhydrid	21
-----------	---	----

2.1.2.4.3	Derivatisierung mit der Bromcyanmethode	22
-----------	---	----

2.1.2.4.4	Reaktionen und Umsetzungen mit EDC	23
-----------	------------------------------------	----

	Derivatisierung von Hyaluronsäure mit Diimidazol	24
--	--	----

	Umsetzung von Mercaptopropionsäure mit EDC	25
--	--	----

2.1.2.5	Funktionalisierung des Polymers im Rahmen der Synthese durch Copolymerisation mit bireaktiven Verbindungen	26
---------	--	----

2.2	Analytische Methoden zur Charakterisierung polymerer Netzwerke	27
-----	--	----

2.2.1	Quellungsfaktor	27
-------	-----------------	----

2.2.2	Wassergehalt	28
-------	--------------	----

2.2.3	Mechanische Eigenschaften	28
-------	---------------------------	----

2.2.4	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	30
-------	---	----

2.2.4.1	Glasübergangstemperatur	30
---------	-------------------------	----

2.2.4.2	Grundlagen der Wärme fluß-DSC	34
---------	-------------------------------	----

2.2.4.3	Ermittlung der Porengrößenverteilung durch Thermoporosimetrie	35
---------	---	----

2.3	Funktionalisierung von Oberflächen	38
-----	------------------------------------	----

2.3.1	Ermittlung der Grenzflächenenergie durch Bestimmung der Kontaktwinkel	38
-------	---	----

2.3.2	Plasmabehandlung	41
-------	------------------	----

2.3.2.1	Plasma und Oberflächen	41
---------	------------------------	----

2.3.2.2	Plasmaanlage und Behandlungsprozeß	44
---------	------------------------------------	----

2.3.3	Chemische Haftvermittler auf Silanbasis	46
-------	---	----

2.3.4	Ellipsometrie	47
2.3.4.1	Polarisation des Lichts	48
2.3.4.2	Ellipsometrische Messungen	50
2.3.4.3	Das Ellipsometer	51
2.3.5	Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscope, AFM)	53
2.3.6	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	54
2.4	Biokompatibilität	54
2.4.1	Vorteile einer α :Si-C Metall Hybridstruktur	55
2.4.2	Hyaluronsäure	55
2.4.2.1	Wirkungsweise der Hyaluronsäure	56
2.4.2.2	Wirkstoffe, die die pharmakologische Wirkung der HA unterstützen	56
2.4.3	Grundlagen der vaskulären Erkrankungen und der Stentbehandlung	57
2.4.4	Zellkulturtests in-vitro	61
3	<u>Experimenteller Teil</u>	62
3.1	Chemische Verfahren zur Vernetzung von Polymeren	62
3.1.1	Derivatisierung der Hyaluronsäure	62
3.1.1.1	Herstellung des Boratpuffers	62
3.1.1.2	Derivatisierung der Hyaluronsäure mit Methacrylsäureanhydrid	62
3.1.1.3	Derivatisierung der Hyaluronsäure mit Itakonsäureanhydrid	63
3.1.1.4	Derivatisierung der Hyaluronsäure mit Mercaptofunktionen	63
3.1.1.4.1	Derivatisierung mit Mercaptopropionsäure	63
3.1.1.4.2	Oxidation der -SH-Bindungen zur Herstellung der Disulfidbrücken	64
3.1.1.4.3	Umsetzung der Hyaluronsäure zu einem Cystein-Derivat	64
3.1.1.5	Derivatisierung der Hyaluronsäure mit einem Aminosäuremethylester	64
3.1.1.6	Photovernetzung der Hyaluronsäurederivate	65
3.1.1.6.1	Herstellung des Photoinitiators	65
3.1.1.6.2	Photovernetzung der methacrylierten Hyaluronsäure	65
3.1.1.6.3	Photovernetzung der itakonisierten Hyaluronsäure	65
3.1.1.7	Vernetzung der mit Mercaptogruppen derivatisierten Hyaluronsäure	66
3.1.2	Vernetzung von Hyaluronsäure mit niedermolekularen Vernetzern	66
3.1.2.1	Vernetzung von Hyaluronsäure mit Glutaraldehyd	66
3.1.2.2	Vernetzung von Hyaluronsäure mit Epichlorhydrin	67
3.1.2.3	Vernetzung von Hyaluronsäure mit Divinylsulfon	68
3.1.2.4	Vernetzung von Hyaluronsäure durch Diglycidylether	68
3.1.3	Vernetzung mit Hilfe von Nullängenvernetzern (zero lenght crosslinker)	68
3.1.3.1	Autovernetzung der HA durch die Bromcyanmethode	68
3.1.3.2	Vernetzung von Hyaluronsäure mit EDC	69
3.1.3.3	Vernetzung mit Hilfe der Diimidazol Methode	69
3.1.4	Vernetzung von Polyethylenglycol (PEG) mit Hexamethylendiisocyanat (HMDI)	69
3.2	Verfahrenstechnischer Teil	70
3.2.1	Herstellungsverfahren der benötigten Polymerformen	70
3.2.1.1	Formgebung von Alginat und Chitosan durch ionothrope Gelbildung	70
3.2.1.1.1	Reinigung von Algiant und Chitosan	70
3.2.1.1.2	Formgebung von Ca-Alginat	71
	Kugeln	71
	Kapseln	71
	Schläuche	71
3.2.1.1.3	Formgebung von Chitosan	71
	Kugeln	71
	Schläuche	72
3.2.1.1.4	Formgebung von Alginat/Chitosan Symplex-Gelen	72
3.2.1.2	Formgebung von mit HMDI vernetztem PEG	72
3.2.1.2.1	Zylinder	72
3.2.1.2.2	Schläuche	73
	Allgemeines Herstellungsverfahren der Schläuche	73
	Herstellung von Schläuchen mit definierter Wandstärke	73

3.2.1.2.3	Folien	74
3.2.2	Herstellung von Haftvermittlersystemen	74
3.2.2.1	Reinigung und Aktivierung der Oberflächen	74
3.2.2.1.1	Chemisches Ätzen der Oberfläche	74
3.2.2.1.2	Ätzen durch Plasmabehandlung	74
3.2.2.2	Haftvermittler auf Silanbasis	75
3.2.2.3	Plasmatechnisch hergestellte Haftvermittler	75
3.3	Analytischer Teil	76
3.3.1	Messung des Quellungsfaktors	76
3.3.2	Ermittlung des Wassergehalts	77
3.3.3	Ermittlung des E-Moduls	77
3.3.4	Thermische Analyse mit Hilfe der Differential Scanning Calometrie (DSC)	78
3.3.4.1	DSC-Messungen der Glasübergangstemperatur und des Schmelzpunktes	78
3.3.4.2	Bestimmung der Glasübergangstemperatur (T_g)	79
3.3.4.3	Untersuchungen von Schmelzvorgängen	79
3.3.4.4	DSC-Messungen zur Bestimmung der Porengrößenverteilung	80
3.3.5	Ermittlung der Grenzflächenenergie Festkörper/Flüssigkeit durch Kontaktwinkelmessungen	81
3.3.5.1	Kontaktwinkelmessung	81
3.3.5.2	Ermittlung der Grenzflächenenergie	82
3.3.6	AFM Messung an Silizium-Wafern	83
3.3.7	Prüfung der Biokompatibilität durch in-vitro Tests	83
3.3.7.1	Verwendete Zellen	83
3.3.7.2	Verwendete Kulturmedien	84
3.3.7.3	Kultivierung und Trypsinierung der Zellen	84
3.3.7.4	Vitalitätstest (MTS-Test)	84
3.3.7.4.1	γ -Sterilisation der HA-Folien	85
3.3.7.4.2	Waschen der Folien	85
3.3.7.4.3	Herstellung von Flüssigextrakten aus Folien	85
3.3.7.4.4	Prüfung der Flüssigextrakte	86
3.3.7.4.5	Direkter Kontakt	86
4	<u>Ergebnisse und Diskussion</u>	87
4.1	Ionothrope Gelbildung	88
4.1.1	Alginat als Polymermatrix	88
4.1.1.1	Funktionalisierung von Alginat zur Eröffnung neuer Anwendungsmöglichkeiten	89
4.1.2	Chitosan als Matrix	90
4.2	Bifunktionelle Vernetzer	91
4.2.1	Vernetzung mit Glutaraldehyd	95
4.2.2	Vernetzung mit Diglycidylether	95
4.2.3	Vernetzung mit Divinylsulfon	96
4.2.4	Vernetzung mit Epichlorhydrin	97
4.3	Nullängenvernetzer (zero-length cross-linker)	97
4.3.1	EDC	97
4.3.2	Diimidazol	98
4.3.3	Einführung von Disulfidbrücken durch Mercaptopropionsäure	98
4.4	Polymeranaloge Umsetzungen an Polymeren	99
4.4.1	Funktionalisierung und nachträgliche Vernetzung von Polysacchariden	99
4.4.1.1	Ausbildung von Disulfidbrücken	101
4.4.1.2	Vernetzung der Hyaluronsäure mit Bromcyan (Autovernetzung)	101
4.4.1.3	Derivatisierung der HA mit Cystein	101
4.4.2	Funktionalisierung von Präpolymeren und radikalische Vernetzung unter Ausbildung eines Netzwerkes	102
4.4.2.1	Derivatisierung der HA mit Methacrylsäureanhydrid	102
4.4.2.2	Derivatisierung von Hyaluronsäure mit Itakonsäureanhydrid	102

4.5	Zellkulturtests	103
4.5.1	Zellwachstumsuntersuchungen bei Zellen auf Folien.....	104
4.5.2	Zellwachstumsuntersuchungen mit Folien auf Zellrasen	107
4.5.3	Zellwachstumsuntersuchungen mit Eluaten auf Zellrasen	108
4.5.4	Korellation der unterschiedlichen Zellkulturansätze	110
4.6	Einfluß der Strahlung auf die Hyaluronsäure.....	110
4.7	Untersuchungen an Haftvermittlersystemen	111
4.7.1	Aktivierung und Reinigung von Oberflächen durch Plasmabehandlung	115
4.7.2	Haftvermittler auf Silanbasis	120
4.7.3	Plasmatechnische Verfahren.....	122
4.7.3.1	Plasmapolymerisierung.....	123
4.7.3.2	Plasmaätzung und Plasmaaktivierung.....	124
4.7.3.3	Schichtdickenbestimmung des Plasmapolymers	128
4.8	Untersuchungen am Polymercontainer aus mit Diisocyanat vernetztem Polyethylenglykol.....	129
4.8.1	Ergebnisse der Quellungsversuche.....	129
4.8.2	Auswertung der E-Module	131
4.8.3	Auswertung der Glasübergangstemperatur.....	134
4.8.4	Einfluß von Additiven auf die Materialeigenschaften von mit HMDI vernetztem Polyethylenglykol.....	139
4.8.4.1	Vorgehensweise beim Einbau der Additive in die PEG-Matrix	139
4.8.5	Ergebnisse der Thermoporosimetrie	140
4.8.5.1	Ermittlung der Oberflächenenergien von durch Plasmabehandlung und durch naßchemische Verfahren geätzten Substraten	148
4.9	Verfahrenstechnische Ergebnisse	150
4.9.1	Möglichkeiten der Vernetzung unter Ausbildung gewünschter Überstrukturen	151
5	<u>Zusammenfassung</u>	156
6	<u>Literatur</u>	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Schematisches Beispiel für Verzweigung und den Übergang zur Vernetzung	10
Abbildung 2-2: Vernetzung von Polymerketten durch bifunktionelle Vernetzer (dunkel hervorgehoben)	11
Abbildung 2-3: Vernetzung von Polymerketten durch Kondensation	11
Abbildung 2-4: Chemische Struktur des Alginats	12
Abbildung 2-5: Herstellung des Chitosans aus Chitin	14
Abbildung 2-6: Urethanbindung durch Isocyanat mit einem Alkohol	16
Abbildung 2-7: Reaktionsschema der Vernetzung von Hyaluronsäure mit Glutaraldehyd	18
Abbildung 2-8: Nukleophile Addition von Divinylsulfon an Hyaluronsäure	18
Abbildung 2-9: Reaktion der Hyaluronsäure mit Diepoxy-Verbindungen	19
Abbildung 2-10: Vernetzung von Hyaluronsäure mit Methacrylsäureanhydrid	21
Abbildung 2-11: Vernetzung von Hyaluronsäure mit Itakonsäureanhydrid	22
Abbildung 2-12: Aktivierung von OH-Funktionalitäten durch Bromcyan und Umsetzung mit Aminen	23
Abbildung 2-13: Reaktion von Polysacchariden mit EDC	24
Abbildung 2-14: Knüpfung einer Peptidbindung durch die Diimidazol-Methode	25
Abbildung 2-15: Reaktion von Mercaptopropionsäure mit Hyaluronsäure	26
Abbildung 2-16:	38
Abbildung 2-17: Effekt eines Sauerstoffplasmas auf eine Polyethylenoberfläche	43
Abbildung 2-18: Schematische Darstellung einer Plasmaanlage	45
Abbildung 2-19: Plasmaanlage (Leistung bis zu 200 W)	45
Abbildung 2-20: Prozeßablauf der Plasmabehandlung	46
Abbildung 2-21: Funktionalisierung einer Oberfläche mit einem Trimethoxyepoxisilan	47
Abbildung 2-22: Reflexion des Lichtes an einer Glasplatte	48
Abbildung 2-23: Nachweis der Polarisations des Lichtes durch Spiegelung an zwei Glasplatten	49
Abbildung 2-24: Schematischer Aufbau eines Ellipsometers	50
Abbildung 2-25: Einwellenlängen-Ellipsometer EL X-1	52
Abbildung 2-26: Prinzip des AFM	53
Abbildung 2-27: Repetiereinheit der Hyaluronsäure	55
Abbildung 2-28: Entstehung einer Gefäßverengung	58
Abbildung 2-29: Plaque und festsitzender Blutpfropfen in einem Gefäß	58
Abbildung 3-1: Grafische Ermittlung des Kontaktwinkels bei einer gut benetzenden Probe	81
Abbildung 3-2: Grafische Ermittlung des Kontaktwinkels bei einer schlechter benetzenden Probe	81
Abbildung 4-1: Quellungseigenschaften von unterschiedlich vernetzter Hyaluronsäure	94
Abbildung 4-2: Unterschiedliche Quellungs-faktoren bei durch polymeranaloge Umsetzung derivatisierter HA und Vernetzung durch bifunktionelle Verbindung	95
Abbildung 4-3: Vergleich der Quellungs-faktoren von HA und Alginat bei unterschiedlicher Derivatisierung	100

Abbildung 4-4: Vergleich des Wachstums von EC auf verschiedenen Materialoberflächen	105
Abbildung 4-5: Proliferation von SMC auf Divinylsulfon im Vergleich zu PS.....	105
Abbildung 4-6: Wachstum von EC auf unterschiedlichen Oberflächen.....	107
Abbildung 4-7: Wachstum von SMC auf unterschiedlichen Oberflächen.....	108
Abbildung 4-8: Wachstum von EC bei Kontakt mit Eluaten aus unterschiedlichen Folien.....	109
Abbildung 4-9: Wachstum von SMC bei Kontakt mit Eluaten aus unterschiedlichen Folien.....	109
Abbildung 4-10: Einfluß der β -Sterilisation auf die HA.....	111
Abbildung 4-11: Stent mit HA beschichtung ohne Haftvermittler nach mechanischer Belastung	112
Abbildung 4-12: Ausschnittvergrößerung eines mit HA bschichteten Stents ohne Haftvermittler	113
Abbildung 4-13: REM-Aufnahme eines mit HA beschichteten Stentsegmentes ohne Haftvermittler	113
Abbildung 4-14: Silizium, unbehandelt	116
Abbildung 4-15: Silizium, 5 Min. in Flußsäure.....	117
Abbildung 4-16: Silizium, Argon-Plasma, 200W, 30 Min.	118
Abbildung 4-17: Silizium, Argon-Plasma, 200W, 30 Min. unter Zugabe von Teflon (PTFE).....	118
Abbildung 4-18: Silizium, Sauerstoff-Plasma, 200W, 15 Min. unter Zugabe von Teflon (PTFE).....	119
Abbildung 4-19: Silizium, Sauerstoff-Wasser-Plasma, 200W, 15 Min. unter Zugabe von Teflon (PTFE)	120
Abbildung 4-20: Mit HA beschichteter Stent mit einer Haftvermittlerschicht auf Basis eines Aminosilans	121
Abbildung 4-21: Ausschnittvergrößerung eines mit HA beschichteten Stents mit Aminosilan Haftvermittler.....	122
Abbildung 4-22: REM-Aufnahme eines mit HA beschichteten Stentsegmentes mit Haftvermittler auf Silanbasis.....	122
Abbildung 4-23: Wassertropfen auf einer reinen Acetessigsäureethylesterschicht ..	127
Abbildung 4-24: Wassertropfen auf einer nachbehandelten Acetessigsäureethylesterschicht	127
Abbildung 4-25: Einfluß der Vernetzermenge auf das Quellverhalten	130
Abbildung 4-26: Einfluß der Vernetzermenge auf das E-Modul.....	131
Abbildung 4-27: Errechnete E-Module unterschiedlicher Materialien	132
Abbildung 4-28: Einfluß von unterschiedlichen Additiven auf das E-Modul	133
Abbildung 4-29: Ermittlung der Glasübergangstemperatur von mit 100 μ l HMDI versetztem PEG	134
Abbildung 4-30: Ermittlung der Glasübergangstemperatur von mit 120 μ l HMDI versetztem PEG	135
Abbildung 4-31: Ermittlung der Glasübergangstemperatur von mit 180 μ l HMDI versetztem PEG	136
Abbildung 4-32: Ermittlung der Glasübergangstemperatur von mit 200 μ l HMDI versetztem PEG	137
Abbildung 4-33: Erste Untersuchung der Porengrößenverteilung durch Termoporosimetrie	141
Abbildung 4-34: Thermogramm der Schmelzpunktdegradation von porengelundenem Wasser	142

Abbildung 4-35: REM-Aufnahme einer Pore aus einer PEG-Probe.....	143
Abbildung 4-36: Porengrößenverteilung von mit Additiven versetztem, vernetztem PEG.....	144
Abbildung 4-37: REM-Aufnahme der Einlagerung eines unlöslichen Additivs in die PEG-Matrix.....	145
Abbildung 4-38: REM-Aufnahme einer Anhäufung von unlöslichen Additiven in der PEG-Matrix.....	145
Abbildung 4-39: Auswirkung des Einbaus von nativer HA auf die Porengrößenverteilung	146
Abbildung 4-40: REM-Aufnahme einer PEG-Matrix nach dem Ausspülen der nativen HA	147
Abbildung 4-41: Aufnahme eines vollständig gecoverten Stents mit vernetzter HA	152
Abbildung 4-42: „Schwimmhäute“ eines gecoateten Koronarstents	153
Abbildung 4-43: Zuvor unbehandelter Stent nach dem Tauchverfahren	154
Abbildung 4-44: Zuvor hydrophilisierter Stent nach dem Tauchverfahren	155

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung und Untersuchung von biokompatiblen, polymeren Netzwerken. Es wurden sowohl künstliche Polymere als auch natürliche Polymere zur Betrachtung herangezogen. Dabei steht neben anderen Materialeigenschaften die Biokompatibilität im Mittelpunkt des Interesses. Der Begriff "Biokompatibel" ist im folgenden definiert:

Physical material that does not cause damage or adversely affect biological function when exposed to the tissue of an organism.

Biokompatibilität ist die Fähigkeit eines Materials, einer Vorrichtung oder eines Systems, seine Aufgabe in einer spezifischen Anwendung ohne klinisch relevante Reaktion des Organismus zu erfüllen.

Ob ein Material biokompatibel ist oder nicht, hängt in erster Linie von seiner Oberfläche ab, da diese in unmittelbarem Kontakt zum Gewebe steht. Daher ist es sinnvoll, von einer Kompatibilität der Oberfläche zu sprechen.

Bezüglich der Oberflächenkompatibilität können die Materialien folgendermaßen eingeteilt werden:

Biotolerante Materialien werden vom umliegenden Gewebe als fremd erkannt, mit einer Bindegewebsschicht umschlossen, aber nicht abgestoßen. Es kommt zu einer Vernarbung des Gewebes.

Bioinerte Materialien sind langzeitstabil und zeigen keine Wechselwirkungen mit dem umliegenden Gewebe.

Bioaktive Materialien sind zu chemischen und biologischen Wechselwirkungen mit Knochen und Gewebe befähigt. Es kommt zur Ausbildung von chemischen Bindungen.

Werkstoffe werden dann als biologisch inkompatibel bezeichnet, wenn sie Substanzen in toxischen oder biologisch wirksamen Konzentrationen für das umliegende Gewebe freisetzen und zu Immunreaktionen wie Entzündungen, Allergien, Nekrosen oder zur Abstoßung führen. Beispiele für derartige Freisetzung von Substanzen durch das Implantat sind Korrosion, Zersetzung von Polymeren oder Herauslösen von Weichmachern und Stabilisatoren bei Polymerimplantaten. Im Idealfall sollten die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Implantatwerkstoffen mit dem zu ersetzenden Gewebe übereinstimmen. Bei einer erwarteten oder erwünschten Korrosion muß diese so langsam verlaufen, daß es zu keinem „tissue overload“, also zu einer Überlastung des Gewebes mit fremden Substanzen, kommt.

Tabelle 1-1: Auftretende Wechselwirkungen zwischen Implantat und Gewebe.

<i>Implantateigenschaft</i>	<i>Gewebereaktion</i>
toxisch	Gewebenekrose, Immunreaktion
inert	Bildung einer nicht-adhärenenten Gewebekapsel um das Implantat
bioaktiv	Auslösen eines biologischen Prozesses
abbaubar	Rückstandslose Auflösung oder Ersatz des Implantats

Bei der Wahl von Materialien für einen Implantationszweck stellt die Verweildauer des Implantats im Körper eine wichtige Größe dar. Es können drei Zeiträume unterscheiden werden.

Unter Ultrakurzzeitimplantaten versteht man Implantate, die nur kurz mit dem Körper in Kontakt kommen, z.B. chirurgische Instrumente bei einer Operation.

Kurzzeitimplantate sind Implantate, die nach einer vorhersehbaren Zeit wieder aus dem Körper entfernt werden, wie z.B. Osteosyntheseplatten, die zur Schienung einer Knochenfraktur eingesetzt werden. Blasenkatheter können ebenfalls unter diesem Gesichtspunkt betrachtet werden.

Dauer- oder Permanentimplantate sollten derart konzipiert werden, daß sie für die Restlebensdauer des Patienten oder des Implantats im Körper verbleiben können. Hierzu zählen kosmetische Implantate genauso wie die im kardiovaskulären Bereich zum Einsatz kommenden Stents.

Die Anforderungen an die Materialeigenschaften eines Permanentimplantates sind somit am größten. Durch den langen Verbleib im Körper treten Reaktionen auf, die bei kurzer Exposition nicht vorkommen. Das muß bei präklinischen Tests bedacht werden, bei denen der Beobachtungszeitraum von den durchgeführten Versuchen eingeschränkt wird. So können bei einem langen Tierversuch, der über ein bis zwei Jahre dauert, keine stichhaltigen Aussagen über das Verhalten nach 20 Jahren im Organismus aufgestellt werden.

Die Frage, welches Material die nötigen Eigenschaften besitzt, kann bisher nicht geschlossen beantwortet werden. Die Entwicklung von biokompatiblen Werkstoffen bleibt somit Gegenstand der Forschung. Festzustellen bleibt, daß die hier getroffenen Definitionen keine Allgemeingültigkeit besitzen, da es auch andere Definitionen in der Literatur gibt. Einen guten Überblick hierzu gibt D.F. Williams in "Fundamental aspects in biocompatibility".

Ähnlich wie bei materialwissenschaftlichen Überlegungen kommt auch im medizintechnischen Bereich den Oberflächen eine grundlegende Bedeutung zu.

Reaktionen finden bei Implantaten hauptsächlich an der Grenzfläche mit dem umliegenden Gewebe oder der Körperflüssigkeit statt. Es kann hier zu unterschiedlichen Antworten des Gewebes kommen, die je nach Werkstoffeigenschaften unterschiedlich ausgeprägt sind. Metalle beispielsweise neigen insbesondere beim Kontakt mit Körperflüssigkeiten zu Korrosion. Polymere und andere Werkstoffe sind zu unterschiedlich stark ausgeprägten Abbaureaktionen mit Folgeprodukten befähigt. Diese haben einen Einfluß auf die Biokompatibilität des Werkstoffs. Als Beispiel kann hier ein degradables Polylactid gelten, das beim Abbau aufgrund der sich bildenden Säurefunktionen lokal zu einem Abfall des pH-Werts führt.

Stents besitzen einen meist metallischen Grundkörper, wie z.B. 316 L medizinischer Edelstahl.

Medizinischer Edelstahl gilt unter diesem Gesichtspunkt als nicht inert. Die Korrosionsprodukte induzieren eine Immunreaktionsantwort. Bei einer Beschichtung mit einer Keramik, wie der im folgenden beschriebenen, amorphen Siliziumcarbid-Schicht (α -SiC), handelt es sich um einen inerten Werkstoff. Inerte Werkstoffe können wie oben beschrieben vom umgebenden Gewebe verkapselt werden. Der Grad der Verkapselung hängt maßgeblich von den elektrischen Oberflächeneigenschaften des Materials ab. So führt die Verwendung eines Halbleiters mit ausreichend großer Bandlücke zu einer verminderten Fibrinosierung^[RZANY03], was im theoretischen Teil ausführlicher beschrieben wird.

Polymere können als Formkörper, wie z. B. Kapsel und Kugel, oder auch in jeder anderen erdenklichen Form, im Körper an den unterschiedlichsten Stellen implantiert werden. Allein die großen Unterschiede, die der Implantationsort mit sich bringt, stellen große Anforderungen an den polymeren Werkstoff. Polymere können aber auch als Oberflächenmaterial eingesetzt werden. Es gibt eine Vielzahl von Anwendungen, bei denen metallische oder keramische Werkstoffe implantiert werden. Eine Kunststoffoberfläche kann sowohl die Einheilung im Körper fördern als wie auch störende Ablagerungen auf Implantaten, gerade in Blutgefäßen, unterbinden. Ein Vorteil ist auch in der Möglichkeit der Polymere zu sehen, daß Wirkstoffe in das Polymer eingebaut und nach der Implantation an die Umgebung abgegeben werden können.

1.2 Einführung in die Zielsetzung und Anspruch der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war nicht die systematische Untersuchung der Eigenschaften von polymeren Netzwerken. Diese Grundlagen sind in Lehrbüchern der Makromolekularen Chemie zu finden. Untersuchungen über das Quellungsverhalten, das E-Modul oder DSC-Messungen wurden durchgeführt, um Chargen unterschiedlicher Herstellungsvarianten miteinander vergleichen zu können. Die genannten Analysen dienen also in erster Linie der Qualitätssicherung und nicht einer didaktischen Untersuchung. Ziel und Aufgabe war es vielmehr, einen polymeren Werkstoff zu finden, der biokompatibel ist und aufgrund der sehr unterschiedlichen Bedingungen im Organismus auch Variationsmöglichkeiten seiner

Eigenschaften bietet, um für einen möglichst breiten Anwendungsbereich geeignet zu sein. Wichtige Anwendungen sind das „tissue engineering“, wie z.B. die Ummantelung von medizinischen Geräten, die Herstellung von Folien als Gewebeersatz, oder auch die Herstellung eines „drug delivery Systems“ (DDS) und das Design eines Containers, der zum Zwecke des „cell seedings“ Zellen aufnehmen, und mit diesen implantiert werden soll. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf die drug-delivery-Systeme im koronaren Bereich gelegt.

Die Rahmenbedingungen für die polymeren Werkstoffe werden im folgenden gegeben.

1. Wasserlösliche Polymere, wie das Polysaccharid Hyaluronsäure, sollen durch geeignete Maßnahmen wasserunlöslich gemacht werden, um metallische Oberflächen damit zu ummanteln.

Folgende Anforderungen werden an das Material gestellt, um als alloplastische Gefäßwandstütze, z.B. als Koronarstent, eingesetzt werden zu können:

- Die Polymerschicht soll biodegradabel über einen Zeitraum von ca. einem Jahr sein.
- Die Polymerschicht soll biokompatibel im Sinne der oben gegebenen Definition sein.
- Das Material muß frei von chemischen Rückständen sein.
- Das „covering“ bzw. „coating“ soll auf der Oberfläche haften und muß die Prozedur der Implantation sowie die Belastungen im Gefäß überstehen.

2. Eine etwas andere Zielsetzung liegt der Herstellung von Schläuchen (Polymercontainern) aus Polyethylenglykol/HMDI zugrunde.

Die Anforderungen an die Polymercontainer sind grundlegend anders, als die Anforderungen an die für das Metallcoating bestimmten, vernetzten Polysaccharide.

Die Anforderungen für das „cell-seeding“ von z.B. Motorneuronen, kann man folgendermaßen zusammenfassen:

- Die Zellcontainer (Schläuche) sollen ein Volumen zwischen 30 und 300 μl aufnehmen.
- Das Polymergerüst sollte am Implantationsort für 6 Monate oder länger stabil bleiben.
- Die Stabilität des Implantates muß ausreichen, um die Zellen am Bestimmungsort zu fixieren.
- Die Diffusionseigenschaften durch die Wandung müssen so beschaffen sein, daß adulte Zellen, insbesondere Motoneuronen und unter Umständen auch Schwann'sche Zellen, lebensfähig bleiben. Im Fall der Motoneuronen soll die Fähigkeit zum Sprossen erhalten bleiben.
- Allgemein sollen Zellen ihre biologische Aktivität (Proteinbiosynthese) beibehalten und unter Umständen auch zur Produktion von Sekundärmetaboliten stimuliert werden.
- Gleichzeitig soll die Diffusionsbarriere groß genug sein, um die Zellen der Immunantwort des Körpers zu entziehen.
- Das Material muß verarbeitbar, d.h. „vernähbar“ und „händlerbar“, sein.

Bei dem mit ca. 300 μl angegebenen Volumen handelt es sich um Zellsuspensionen, wobei auch genetisch manipulierte Zellen in Frage kommen. Darüber hinaus ist ein so gearteter Wirkstoffcontainer auch für ein drug-release-System denkbar, also als ein Wirkstoffdepot für die am Wirkort benötigten Pharmazeutika.

Von besonderer Bedeutung ist der Punkt der Barriere, also groß genug für Nutriens und so klein, daß die Zellen der Immunantwort entzogen werden, was den Vorteil bringt, daß nicht nur unspezialisierte Embryonalzellen, sondern auch adulte Zellen zum Einsatz kommen können.

Die Strategie zum Erreichen des gesteckten Ziels war, daß bekannte Polymere herangezogen werden, um sie durch geeignete Verfahren zu vernetzen. Das Präpolymer wurde so gewählt, daß es für sich genommen schon unbedenklich in der Anwendung in oder am menschlichen Körper ist. Dazu wurde als Basis auf die Ergebnisse der Immobilisierung von ganzen Zellen zurückgegriffen. Die Biotechnologie verfügt über ein überaus großes Spektrum von Verfahren, um mit den

unterschiedlichsten Reagenzien die unterschiedlichsten Bindungstypen zu generieren. Im Unterschied zur Immobilisierung ganzer Zellen, bei der eine möglichst schonende Möglichkeit der Vernetzung gefordert ist, um die vitalen Funktionen der Zellen zu erhalten, wurde das Hauptaugenmerk auf das „cell-seeding“ gerichtet. Der Unterschied besteht darin, daß die Zellen in einem sekundären Schritt mit dem polymeren Netzwerk in Berührung kommen, während in einem primären Vorgang der „Container“ zur Aufnahme der Zellen hergestellt und gegebenenfalls auch sterilisiert wird.

1.3 Motivation für die Entwicklung eines DDS im koronaren Bereich

Nach der Implantation von koronaren Stents treten bei vielen Patienten inflammatorische Reaktionen auf, die in einigen Fällen zu einer Restenose führen, die eine Nachbehandlung erforderlich macht. Durch eine modifizierte Oberfläche des Stents soll diesem Problem begegnet werden. Dabei sollen Medikamente in die Oberfläche eingeschlossen werden, die antiinflammatorisch wirken und dem Problem begegnen. Die Oberfläche soll aus einem biodegradablen Polymer bestehen. Als biodegradables und darüber hinaus biokompatibles Polymer wurde die Hyaluronsäure gewählt, die zudem schon ohne die Einbettung von Wirkstoffen eine antiinflammatorische Wirkung in Koronargefäßen zeigt.

Die Polymermatrix aus Hyaluronsäure soll als Träger für Wirkstoffe dienen. Eine weitere Randbedingung ist, daß das Polymer keine nachteiligen Effekte zeigt, die durch eine erhöhte Gabe an Pharmakon wieder ausgeglichen werden muß. Das Ziel ist es hier, daß nach der Stentimplantation das Volumen des Gefäßes für den Blutstrom frei ist und nicht durch körpereigene Heilprozesse vermindert wird. Wichtig ist die Forderung nach einem degradablen Polymer. Die Wirkstoffe, die eine In-Stent-Restenose verhindern sollen, werden üblicherweise in einem Zeitfenster von einigen Stunden bis zu mehreren Wochen freigesetzt. Nach Abgabe der Wirksubstanzen würde ein nicht degradables Polymer ebenso wie der Stent im Körper verbleiben, eine nachteilige Reaktion des Polymers könnte durch das Wirkstoffdepot nicht mehr

ausgeglichen werden, da der Wirkstoffvorrat aufgebraucht ist. Im Falle eines abbaubaren Depots würde die Matrix zeitgleich mit dem Ende der Wirkstofffreisetzung oder nur leicht verzögert degradieren. Ein nachteiliger Effekt ist dann nicht zu erwarten. Der metallische Grundkörper des Stents ist in diesem Zusammenhang unkritisch. Hierzu liegen umfangreiche Daten aus klinischen Studien vor, die einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren umfassen. Das Problem der In-Stent-Restenose ist nur in den ersten 4 Wochen nach Implantation aktuell.

2 Theoretischer Teil

2.1 Polymere Netzwerke

Die Anwesenheit von mehr als zwei funktionellen Gruppen führt zur Ausbildung von verzweigten Makromolekülen oder von polymeren Netzwerken, wobei die Grenze zwischen verzweigten und vernetzten Makromolekülen nicht klar zu ziehen ist.

Ob eine makromolekulare Verbindung verzweigt oder vernetzt ist, ist eine Frage der Kettenlänge (des Polymerisationsgrades) der Hauptkette und des Vernetzungsgrades, entscheidend ist also die Teilchengröße der vernetzten Partikel. Im allgemeinen gilt: Sind die Verbindungen löslich, spricht man von Verzweigung, sind die Verbindungen in allen Lösungsmitteln unlöslich, so liegt ein vernetzter Zustand vor. Eine gute Übersicht zu diesem Thema bietet bereits vorhandene Fachliteratur^{[OKAY00],[UHRICH97],[GILL00],[HOLST79],[ROSE00]}. Bei vernetzten Polymeren sind alle Ketten der gesamten Substanz durch kovalente Brücken (Bindungen) miteinander verknüpft. Es ist bei solchen Materialien nicht mehr sinnvoll von Molekülen als kleinsten Teilchen zu sprechen.

Der Übergang vom verzweigten zum vernetzten Material wurde am Beispiel von Styrol und Divinylbenzol intensiv untersucht. Bei einer bestimmten Menge von Vernetzungsstellen gibt es einen kritischen Primärpolymerisationsgrad, bei dem ein zunächst verzweigtes Polymer in ein vernetztes Polymer übergeht. Dabei gilt: Je höher die Vernetzungsdichte ist, um so niedriger liegt der Primärpolymerisationsgrad. Es kann von einer kritischen Vernetzungsdichte bei gegebenem Primärpolymerisationsgrad gesprochen werden. Der Übergang von verzweigten Substanzen zu vernetzten Materialien ist bei der kritischen Vernetzungsdichte durch den Gelpunkt gekennzeichnet. Als Schaubild sind in der folgenden Abbildung verzweigte und vernetzte Strukturen gegenübergestellt.

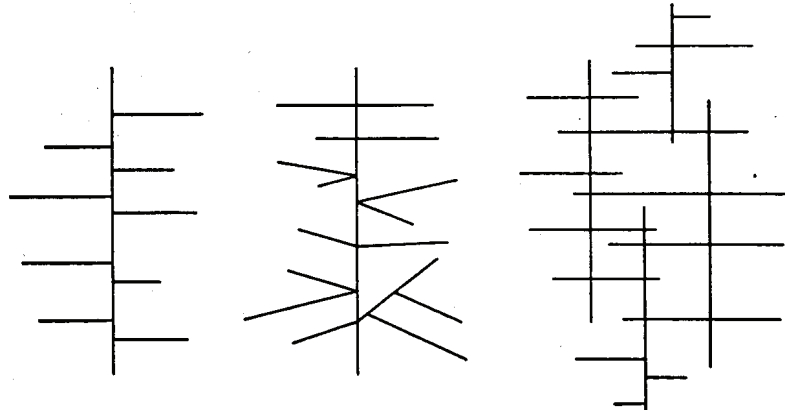


Abbildung 2-1: Schematisches Beispiel für Verzweigung und den Übergang zur Vernetzung

Bei der Herstellung von verzweigten bzw. vernetzten Polymeren lassen sich zwei prinzipiell unterschiedliche Methoden unterscheiden.

1. Die Polymersynthese in Gegenwart von mehr als bifunktionellen Verbindungen
 - a. vernetzende, radikalische Polymerisation
 - b. vernetzende Polykondensation
2. Die Vernetzung von fertigen Polymerketten oder Präpolymeren durch funktionelle Gruppen am Präpolymer
 - a. niedermolekulare, bifunktionelle Vernetzungsmittel
 - b. niedermolekulare, polyfunktionelle Vernetzungsmittel
 - c. makromolekulare, bifunktionelle Vernetzer
 - d. makromolekulare, polyfunktionelle Vernetzer

Das folgende Schema zeigt die Vernetzung von fertigen Polymerketten durch bifunktionelle Vernetzer.

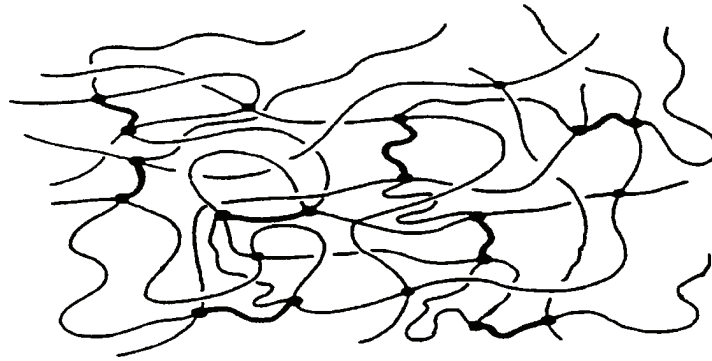


Abbildung 2-2: Vernetzung von Polymerketten durch bifunktionelle Vernetzer (dunkel hervorgehoben)

Eine Vernetzung von vorhandenen Polymerketten durch einen Kondensationsschritt ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

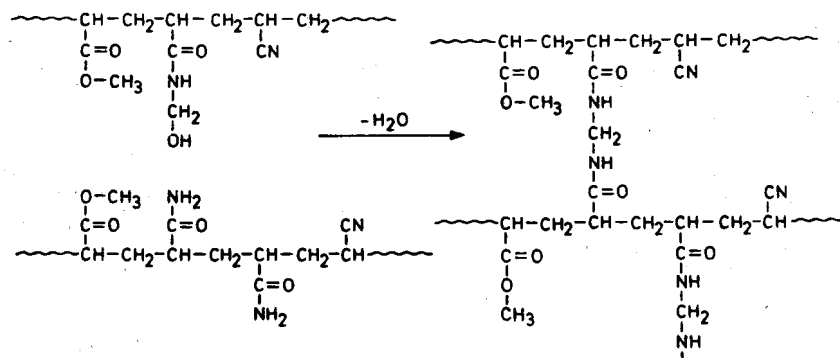


Abbildung 2-3: Vernetzung von Polymerketten durch Kondensation

In der vorliegenden Arbeit wird eine Strategie verfolgt, bei der bekannte (biokompatible) Polymere mit unterschiedlichen Vernetzern zur Reaktion gebracht werden. Dabei wird erwartet, daß das resultierende Netzwerk ebenfalls biokompatible Eigenschaften aufweist.

2.1.1 Ionothrope Gelbildung

Die ionothrope Gelbildung ist aus der Biotechnologie als Methode zur Immobilisierung ganzer Zellen bekannt.^{[KLEIN86],[KLEIN88],[VORLOP84]}

Dabei macht man sich den Umstand zunutze, daß die Polyelektrolyte löslich sind. Bei Zugabe von bi- bis multivalenten Gegenionen bilden sich wasserunlösliche Salzpaare.

2.1.1.1 Alginat

Chemisch besteht die Polyuronsäure Alginat aus β -1,4-glykosidisch verknüpften D-Mannuronsäure-Einheiten, mit gelegentlichen Einschüben von L-Guluronsäure-Einheiten. Ihre chemische Struktur ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

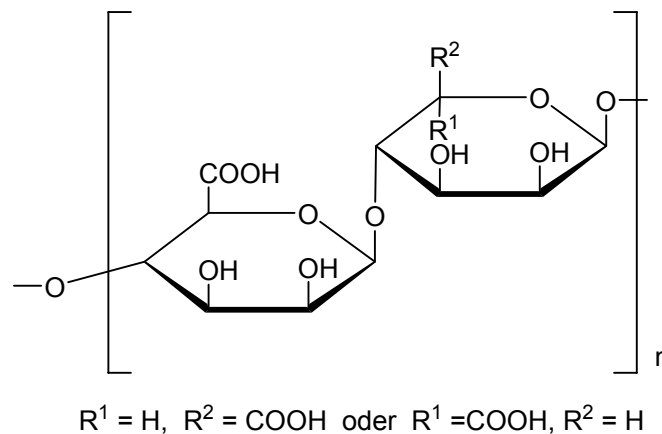


Abbildung 2-4: Chemische Struktur des Alginats

In der Natur findet sich Alginat in den Braunalgen mit bis zu 40 % Gewichtsanteil. Es kann durch Einwirkung von Soda oder allgemein Alkalien aus *Laminarian digitata* bzw. *L. cloustoni*, *Macrocystis pyrifera* und *Ascophyllum nodosum* gewonnen werden. Dabei geht der Polyelektrolyt in Lösung.

Alginat ist in der Lebensmittelindustrie eingeführt und wird vielseitig verwendet.^[GROBOILLAT94]

Die Netzbildung geschieht mit Hilfe von mehrvalenten Kationen, wie Ca^{2+} oder Al^{3+} [KLEIN86],[KLEIN88]. Dabei werden zwei Natrium-Ionen durch ein Ca^{2+} ersetzt. Bei diesem Prozess bildet das Alginat eine „Eierkartonstruktur“ [BUCHHOLZ97] aus, das Kation besetzt die Lücken zwischen verschiedenen Polymerketten. Es resultiert ein unlösliches Produkt. Die eingelagerten Ionen stehen mit den im Medium enthaltenen Ionen im Gleichgewicht. Hohe Konzentrationen (10 mM) an Na^+ -Ionen bewirken einen Austausch und ein Auflösen des Netzwerkes.

Aus der Literatur ist das Unvermögen unlösliche Netzwerke mit Hilfe von Magnesium als zweiwertigem Kation zu bilden bekannt. [VORLOP84],[BUCHHOLZ97] Hier ist auch der nachteilige Effekt von kalziumkomplexierenden Substanzen wie dem Phosphat beschrieben, die ebenfalls zum Auflösen der Netzwerke führen.

2.1.1.2 Chitosan

Chitosan wird durch Deacetylierung (Verseifung) und teilweise Depolymerisierung aus Chitin gewonnen. Chitin ist neben Cellulose das am häufigsten vorkommende Naturprodukt, wobei sich Chitin und Cellulose stark ähneln. Das als Derivat der Cellulose (mit 2-Acetamido- anstelle der 2-Hydroxy-Gruppen) formulierbare Chitin stellt bei Anthropoden das Außenskelett dar. Es kommt als Skleroprotein in Mollusken vor und ferner in den Zellwänden von Algen und Hefen.

Die Strukturen von Chitin und Chitosan und die Herstellung von Chitosan aus Chitin sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

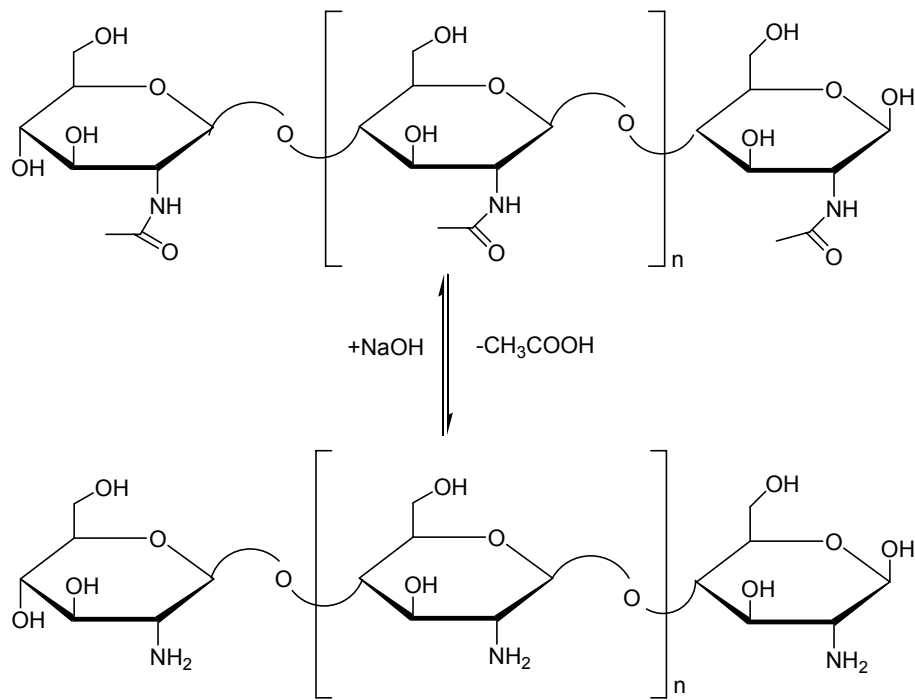


Abbildung 2-5: Herstellung des Chitosans aus Chitin

Das Chitosan kann bis zu 98 % deacetyliert vorliegen.

Chitosan ist ein Poly- β -1,4-N-acetyl-D-Glucosamin mit Molmassen von $1\text{--}2 \cdot 10^6$ g/mol und ist in Säuren außer in Schwefelsäure löslich.

Das Material bietet den Vorteil, daß der Einsatz, anders als beim Alginat, unabhängig von der bestehenden Salinität erfolgen kann, und es in beispielsweise Kochsalzumgebung eine gute Stabilität aufweist.^{[YAZDANI-PEDRAM00],[DENUZIÈRE98]}

Die Netzwerkbildung geschieht in ähnlicher Weise wie beim Alginat. In diesem Fall kommt ein mehrvalentes Anion, wie das Natriumpentaphosphat, zum Einsatz. Das mehrvalente (fünfach geladen) Polyphosphat wird durch Salze, wie sie in biologischen Systemen als Puffer eingesetzt werden, weniger leicht ausgetauscht. Das zweifach geladene Ca^{2+} würde, wie beim Alginat beschrieben, sehr leicht durch z.B. Na^+ ersetzt werden. Chitosan/Pentaphosphat-Gele besitzen so eine gewisse Stabilität in Kochsalzlösungen und in Gegenwart von Phosphatpuffern.

2.1.1.3 Symplexgelbildung Alginat-Chitosan

Allgemein wird Alginat durch mehrvalente Kationen, Ca^{2+} oder Al^{3+} , in den wasserunlöslichen Zustand überführt, während beim Chitosan ein mehrwertiges Phosphat eingesetzt wird. Möglich ist aber auch ein Symplexxgel, bei dem das Polykation Chitosan mit dem Polyanion Alginat wechselwirkt.

Die Symplexbildung geschieht über eine Metathese, eine doppelte Umsetzung.^{[KRASEMANN00],[VORLOP84]}

Das Chitosan reagiert mit dem Polyphosphat und führt zu einer Strukturgebung. Das Ca-Alginat reagiert mit dem Polyphosphat unter Ausbildung des schlecht löslichen Ca-Polyphosphats und des löslichen Na-Alginats, das seinerseits in Konkurrenz mit dem chitosangebundenen Polyphosphat tritt. Es bildet sich Alginat/Chitosan, ein Symplexxgel.^{[OERTHER99],[VORLOP84]}

2.1.2 Kovalent vernetzte, polymere Netzwerke

Zur Herstellung der biokompatiblen, polymeren Netzwerke werden im Rahmen dieser Arbeit wasserlösliche Polymere, deren biologische Eignung bekannt ist, durch geeignete Verfahren vernetzt und damit wasserunlöslich gemacht. Dazu kann aus der Fülle der wasserlöslichen Polymere, die schon im oder am Körper im klinischen Einsatz sind, eine Auswahl getroffen werden.

Zudem steht ein ebenso großes Repertoire an chemischen Reaktionen für die Vernetzung der Polymerketten zur Verfügung. Die Auswahl richtet sich nach der technischen Realisierbarkeit des Verfahrens. So kommen Vernetzungsstrategien, die eine zu lange Reaktionsdauer besitzen, nicht zum Einsatz. Eine spätere Umsetzbarkeit in ein technisches Beschichtungsverfahren muß gegeben sein. Ebenso fallen solche Vernetzer aus dem Raster, die zu Verbindungen führen, die beim Abbau (z.B. Hydrolyse) zu toxischen Verbindungen zerfallen.

2.1.2.1 Vernetzung durch niedermolekulare Verbindungen

Aus der Biotechnologie und Biochemie sind viele Reaktionen und Reagenzien bekannt, mit deren Hilfe sich Enzyme oder auch ganze Zellen immobilisieren lassen. Aus der Vielzahl dieser Reaktionen wird eine Auswahl getroffen, von der anzunehmen ist, daß in Kombination mit an sich unbedenklichen, wasserlöslichen Polymeren, biokompatible Werkstoffe entstehen.

2.1.2.2 Vernetzung von Polyethylenglykol mit Hexamethylen-diisocyanat (HMDI)

Polyethylenglykol ist in der Biotechnologie bekannt und eingeführt. Es wird schon seit 1978 in der Immobilisierung von Zellen eingesetzt.^[KLEIN86] Abbaukinetiken für diese Stoffklasse sind bekannt und beschrieben. Polyurethane sind in der Medizintechnik im Bereich von Bauchklappen und Herzklappen ebenfalls bekannt.

Im vorliegenden Fall wurde Polyethylenglykol mit HMDI vernetzt. Das verwendete Isocyanat wird in der Industrie dafür benutzt, um Polyurethan-Formulierungen weicher und elastischer zu machen.

Die für die Thermoporosimetrie (siehe Kap. 2.2.4.3) hergestellten Proben bestanden aus mit dem Isocyanat (HMDI) vernetzten Polyethylenglykol. Die Reaktion von einem Isocyanat mit einer Diolkomponente ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

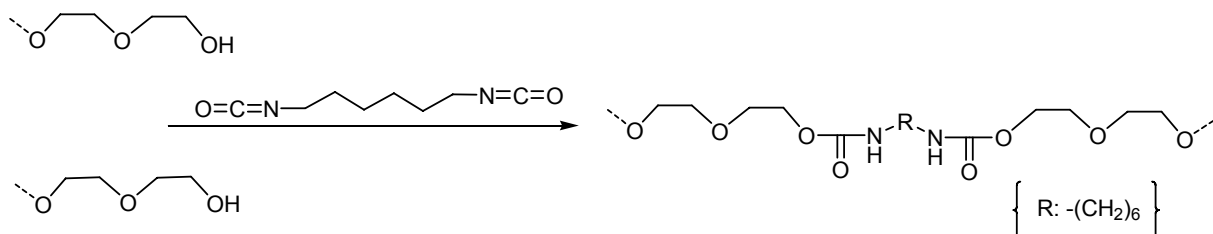


Abbildung 2-6: Urethanbindung durch Isocyanat mit einem Alkohol

Das Wasserstoffatom direkt an der Urethanbindung ist acide und kann mit weiterem Isocyanat reagieren, um so das dreidimensionale Netzwerk zu bilden.

Diese Reaktion ist ein Beispiel für die Vernetzung eines Präpolymers durch eine bifunktionelle Verbindung.

2.1.2.3 Kovalente Vernetzung von Hyaluronsäure durch niedermolekulare, divalente Verbindungen

Bei der Vernetzung der Hyaluronsäure stehen unterschiedliche, chemische Gruppen des Polysaccharids zur Verfügung. Neben den Hydroxylgruppen gibt es Carbonylgruppen und N-Acetylamingruppen. Im folgenden werden die unterschiedlichen Vernetzungsreagenzien mit den zugrundeliegenden, chemischen Reaktionen gezeigt.

2.1.2.3.1 Vernetzung mit Glutaraldehyd

Bei der Vernetzung von Hyaluronsäure mit Glutaraldehyd werden die Hydroxylgruppen für die Netzbildung herangezogen.^{[JAYAKRISHNAN96],[TOMIHATA97]} Aldehyde reagieren mit den Alkoholgruppen zu den aus der Schutzgruppenchemie bekannten Acetalbindungen, wobei sich das Halbacetal sowohl säure- als auch basenkatalysiert bilden kann. Das Acetal bildet sich nur im Säuren und kann so auch wieder gespalten werden.

Die Reaktion ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

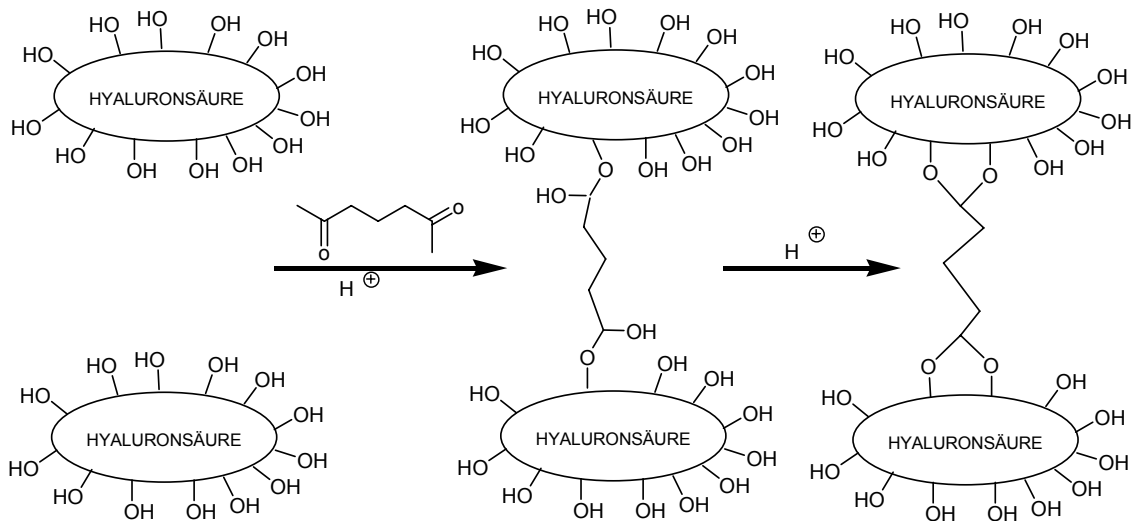


Abbildung 2-7: Reaktionsschema der Vernetzung von Hyaluronsäure mit Glutaraldehyd

2.1.2.3.2 Vernetzung mit Divinylsulfon

Divinylsulfon ist ein difunktionelles, heteroanaloges Michael-Reagenz.^[TOMIHATA97] Die beiden α, β -ständigen Vinylfunktionen werden von der Elektronen ziehenden Sulfongruppe aktiviert. Die Vernetzung erfolgt daher in einer Michael-analogen Addition der Hydroxylgruppen der Hyaluronsäure an die Vinylgruppen des Divinylsulfons. Die Reaktion ist in der folgenden Abbildung gezeigt.^{[SHU02],[SHU03]}

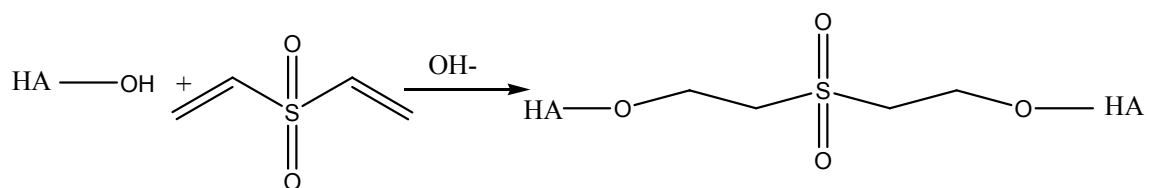


Abbildung 2-8: Nukleophile Addition von Divinylsulfon an Hyaluronsäure

2.1.2.3.3 Vernetzung mit Dicycldylether (Diepoxiden)

Als Vernetzungsreagenz wird Ethylenglykoldiglycidylether eingesetzt.^[CAMPOCCIA98]

Bei der Umsetzung der Epoxidringe mit den Hydroxylgruppen der Hyaluronsäure^{[MORIYAMA99],[PRESTWICH98]} erfolgt die chemische Reaktion, indem der

Epoxidring sich öffnet und die freie Bindungsstelle zur Verfügung steht.^[LEE99] Die Reaktion ist formal eine S_N2 -Reaktion. Der Ring öffnet sich und nimmt so die Stellung einer intramolekularen Abgangsgruppe ein. Ein Carbokation wird gebildet, aber in einem konzertierten Schritt mit dem Elektronenpaar des angreifenden Sauerstoffes abgefangen. Die Reaktion ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

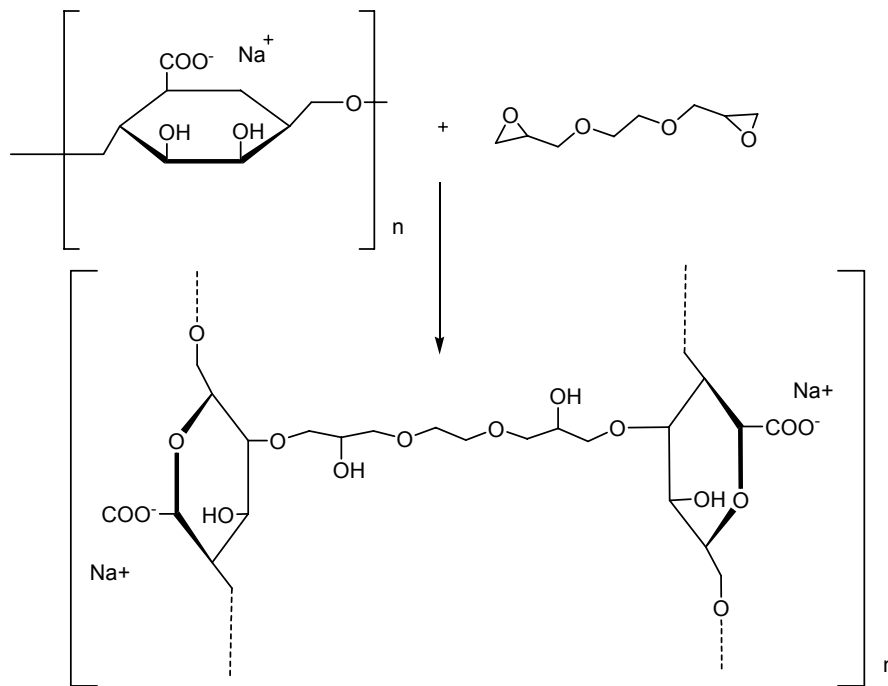


Abbildung 2-9: Reaktion der Hyaluronsäure mit Diepoxy-Verbindungen

Zur Darstellung der Hyaluronsäure wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Glucuronsäure als Repetiereinheit dargestellt.

2.1.2.3.4 Vernetzung mit Epichlorhydrin

Der Epoxidring des Epichlorhydrins reagiert in der oben geschilderten Art und Weise. Das Chlor reagiert unter Freisetzung von HCl ^[TOMIHATA97] in einer ebenfalls nukleophilen Substitution, wobei Chlor bzw. HCl eine bessere Abgangsgruppe darstellt, als die Ringöffnung unter Ausbildung einer Hydroxylgruppe. Die Abspaltung des Chlorwasserstoffes geschieht schon unter milderen Bedingungen und damit leicht.^[SIMKOVIC00]

2.1.2.4 Polymeranaloge Reaktionen zur Funktionalisierung des Präpolymers

Funktionelle Gruppen an Polymeren besitzen die gleiche Reaktivität wie an kleinen Molekülen und stehen für chemische Reaktionen zur Verfügung. So können Polysaccharide durch geeignete Reagenzien derivatisiert werden, um ihre chemischen Eigenschaften zu verändern. Die Molmasse der Ausgangspolymere bleibt dabei erhalten. Möglich ist hier auch die Herstellung von Reaktionsgruppen, die dann zu Vernetzungsreaktionen fähig sind.^[SMEDS01] Beispiele hierzu gibt es auch aus der Biochemie. Enzyme, die als Makromoleküle betrachtet werden können, lassen sich derivatisieren. Über die neu hinzugekommenen Gruppen läßt sich dann eine Ankopplung (Immobilisierung) an einen Träger vornehmen.^[VAIDYA04]

Die verwendeten Reaktionen sind im folgenden aufgeführt.

2.1.2.4.1 Derivatisierung mit Methacrylsäureanhydrid

Bei dieser Vernetzungsstrategie werden reaktive Gruppen durch kovalente, polymeranaloge Umsetzungen an die HA gebunden, welche dann in einem zweiten Schritt photochemisch zur Reaktion gebracht werden.

Die Reaktion zur Ausbildung der Netzwerkstruktur ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

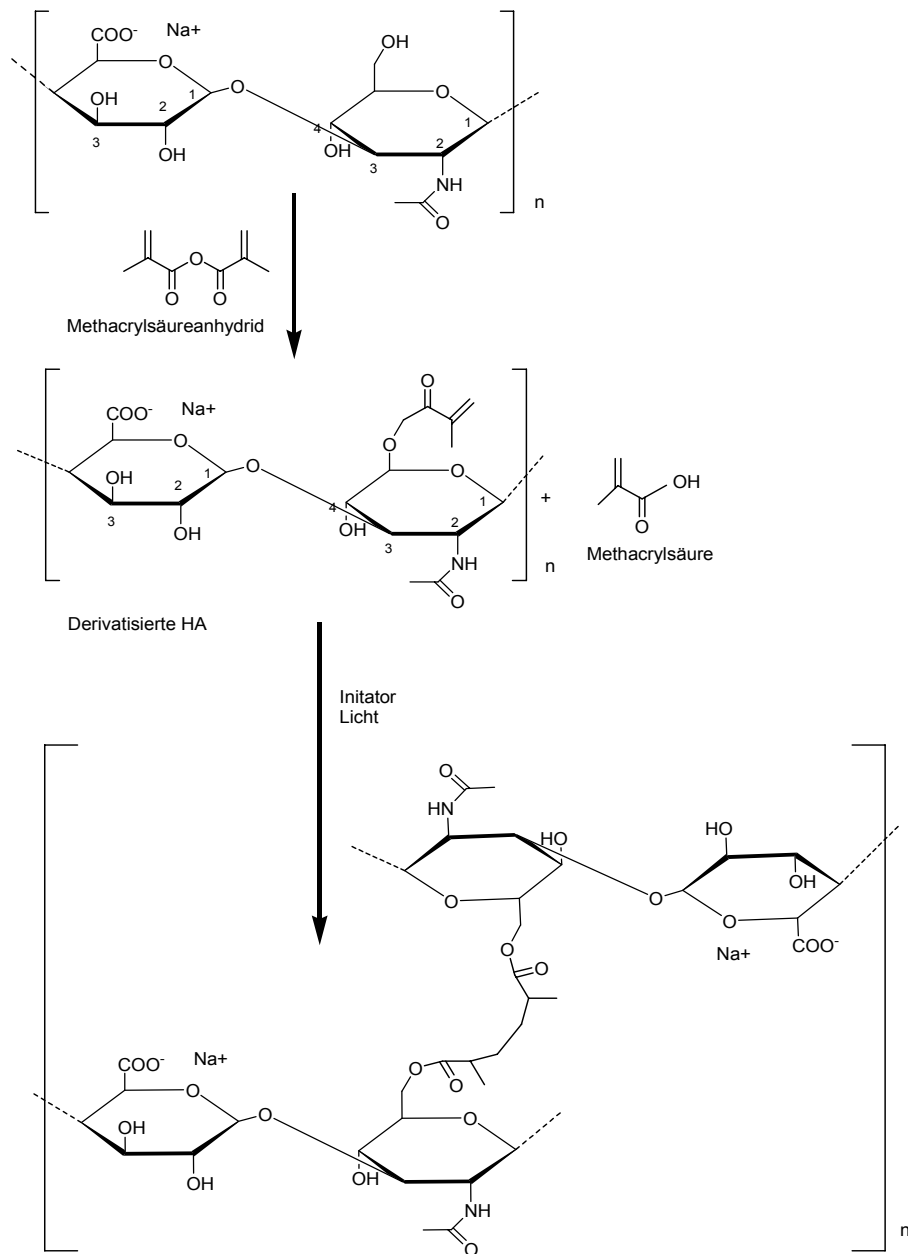


Abbildung 2-10: Vernetzung von Hyaluronsäure mit Methacrylsäureanhydrid

2.1.2.4.2 Derivatisierung mit Itakonsäureanhydrid

Die Vernetzung geschieht analog zu der oben beschriebenen Methode. Der Vorteil liegt in der Verwendung des Itakonsäureanhydrids, das, anders als das Methacrylsäureanhydrid, aus natürlichen Rohstoffen gewonnen werden kann und außerdem bei der Immobilisierung von Enzymen in der Biotechnologie bekannt und eingeführt ist.^{[VAIDYA04a],[VAIDYA04b]} Es kann daher angenommen werden, daß evtl.

verbleibende Rückstände weniger toxisch als die des Methacrylsäureanhydrids reagieren.

Die Reaktion von Polysacchariden, wie der Hyaluronsäure, mit Itakonsäureanhydrid und die nachfolgende Vernetzung ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

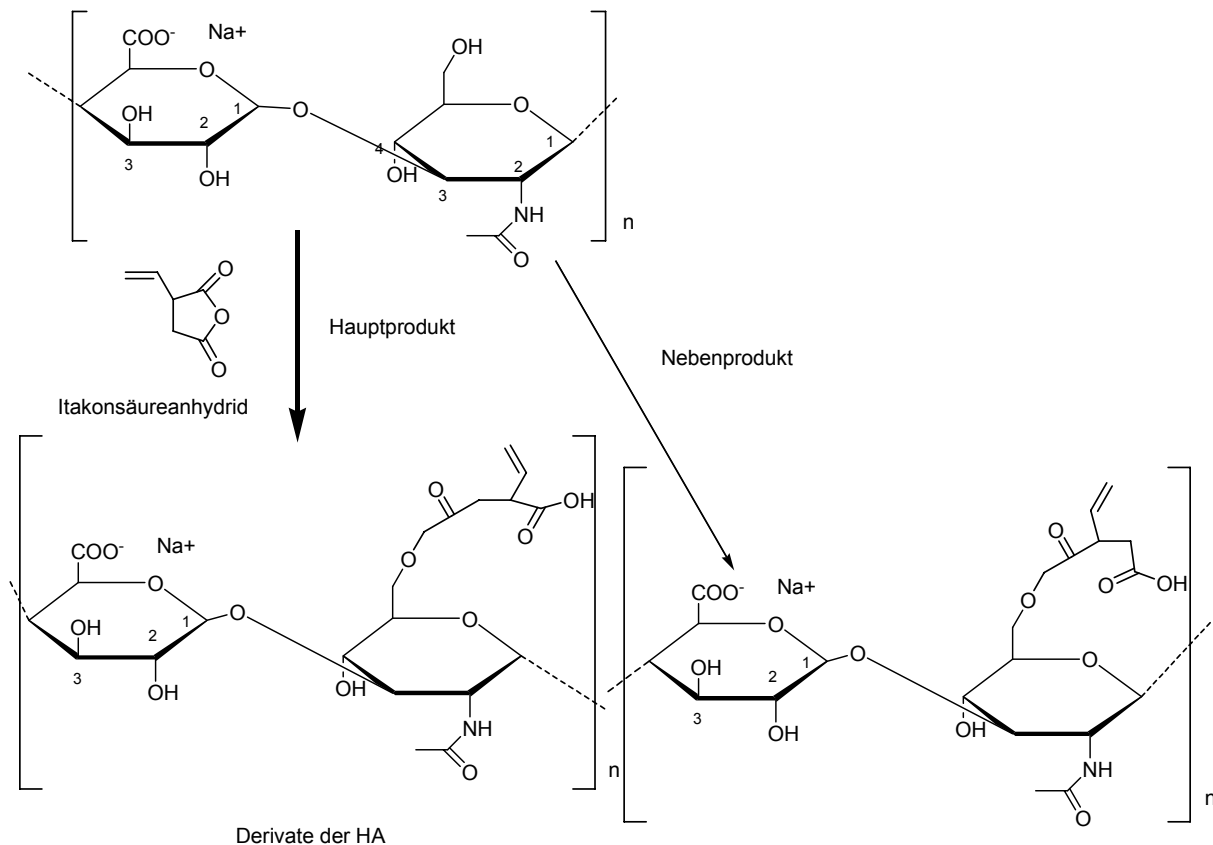


Abbildung 2-11: Vernetzung von Hyaluronsäure mit Itakonsäureanhydrid

2.1.2.4.3 Derivatisierung mit der Bromcyanmethode

Peptidbindungen stellen eine bekannte Leitstruktur aus der Biologie dar, sie bilden z. B. die Proteinstruktur aus. Mit dem Polysaccharid reagiert das Bromcyan unter Ausbildung eines aktiven Komplexes, der dann mit Aminen zu Isoharnstoffen, Carbamaten und bei entsprechender Reaktionsführung zu den Imidocarbamaten führt.^[SHAFFER00] Bei Zugabe einer Diaminverbindung kann sich der vernetzte Zustand ausbilden.^{[DESAI93],[LUO00]}

Die möglichen Reaktionswege sind in der folgenden Abbildung dargestellt.^[BUCHHOLZ97]

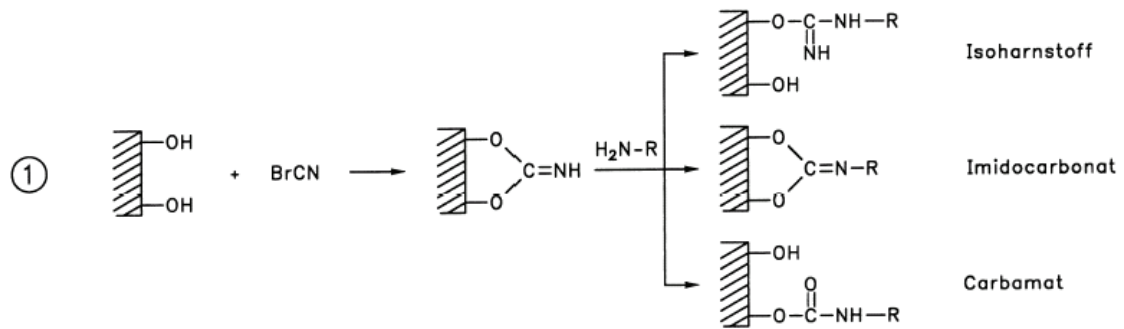


Abbildung 2-12: Aktivierung von OH-Funktionalitäten durch Bromcyan und Umsetzung mit Aminen

2.1.2.4.4 Reaktionen und Umsetzungen mit EDC

Die Reaktion mit dem wasserlöslichen Carbodiimid ist ein Beispiel für einen zero-length Crosslinker. Das Carbodiimid aktiviert, wie in der folgenden Abbildung gezeigt, die Carbonylfunktion der HA und macht sie für die Ausbildung von Peptidbindungen oder Esterbindungen auch im wässrigen Medium potent.^[Luo01]

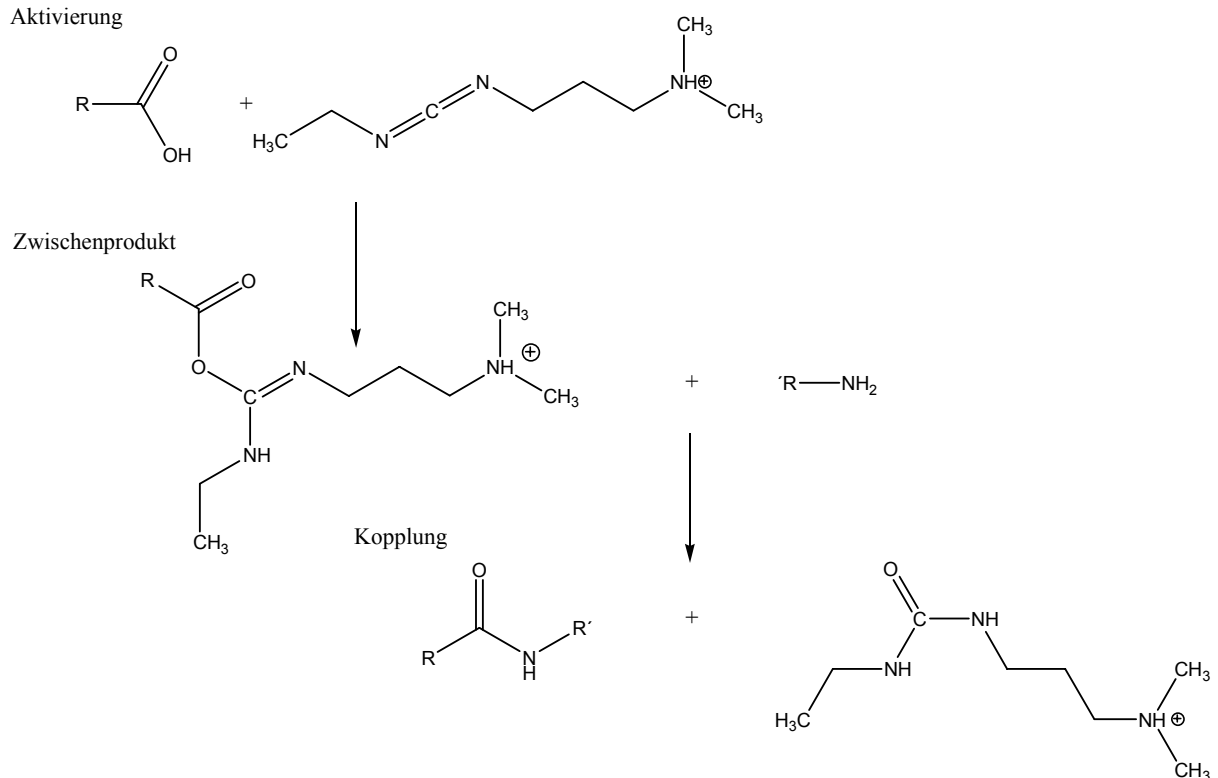


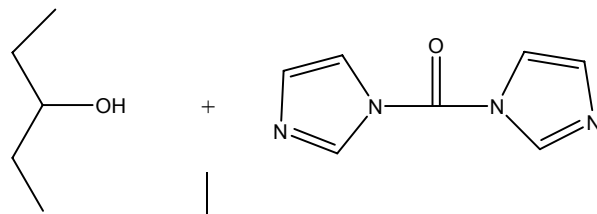
Abbildung 2-13: Reaktion von Polysacchariden mit EDC

Derivatisierung von Hyaluronsäure mit Diimidazol

Während bei der EDC-Methode Säurefunktionen aktiviert werden, werden über das Diimidazol Hydroxylgruppen aktiviert, die dann mit Aminen ebenfalls zu Peptidbindungen weiterreagieren. Als Abgangsgruppe erhält man Imidazol. Die aktivierte Zwischenverbindung hydrolysiert unter Rückbildung einer Hydroxylgruppe und zu Imidazol.

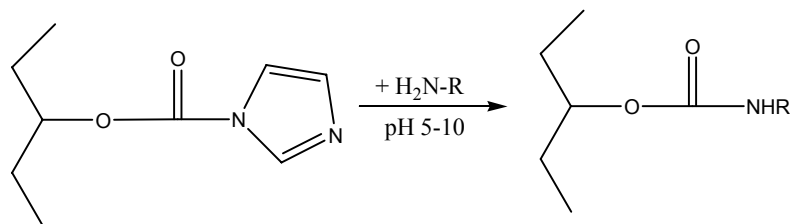
Der Reaktionsverlauf ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

Aktivierung



Aceton - Imidazol

Kopplung



Hydrolyse

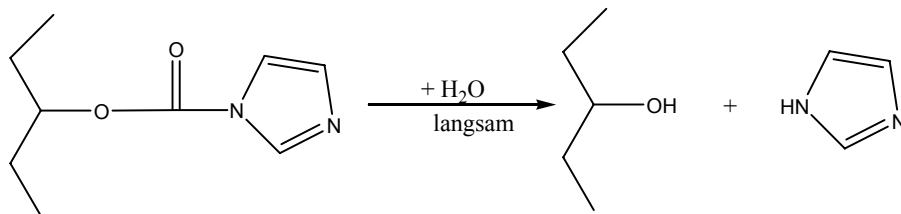


Abbildung 2-14: Knüpfung einer Peptidbindung durch die Diimidazol-Methode

Umsetzung von Mercaptopropionsäure mit EDC

Die Aktivierung von Carbonylgruppen kann für eine weitere, interessante Vernetzungsstrategie verwendet werden. Dabei werden Disulfidbrücken gebildet, die ebenfalls eine Leitstruktur der Biologie darstellen. Aus Disulfidbrücken werden einige gestaltgebende Bindungen bei Enzymen geknüpft. Dabei wird, wie in Kapitel 2.1.2.4.4 beschrieben, die Säurefunktion aktiviert. Die Reaktion ist im folgenden gezeigt.

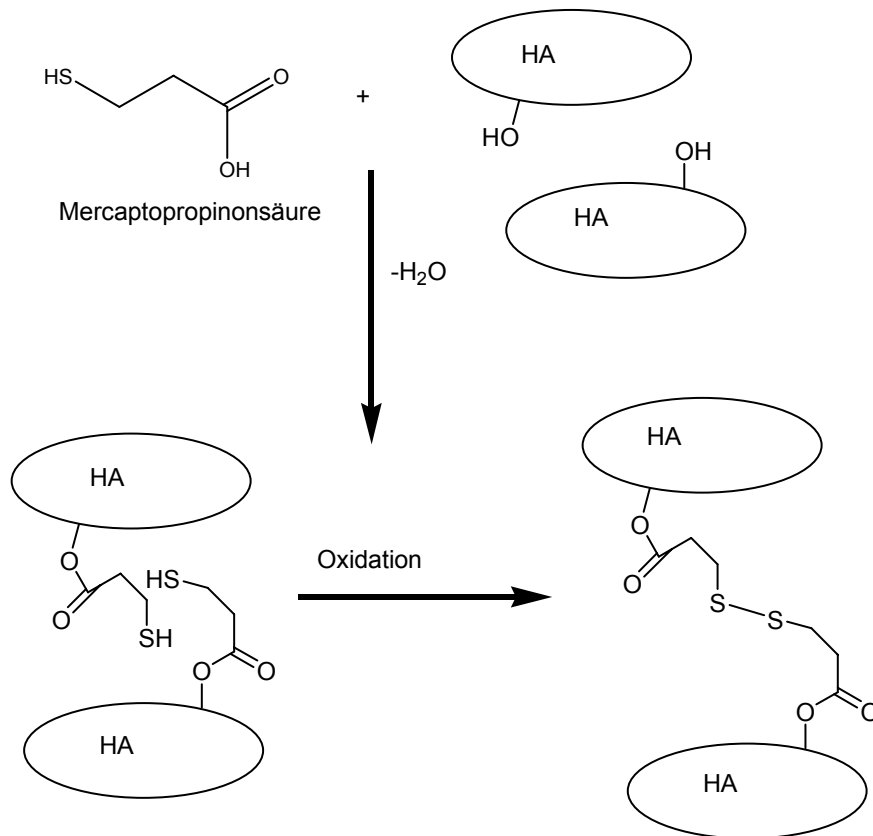


Abbildung 2-15: Reaktion von Mercaptopropionsäure mit Hyaluronsäure

Die Abbildung zeigt den schematischen Ablauf der in Kapitel 2.1.2.4.4 beschriebenen Abläufe. Die Säurefunktion wird aktiviert, so daß formal eine Esterbildung in wäßriger Umgebung abläuft. Die anschließende Oxidation bildet aus den beiden Mercaptogruppen die bindende Disulfidbrücke.

2.1.2.5 Funktionalisierung des Polymers im Rahmen der Synthese durch Copolymerisation mit bireaktiven Verbindungen

Diese Strategie wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verfolgt und soll hier nur der Vollständigkeit halber vorgestellt werden.

Bei der Polymerherstellung können Monomere, die funktionelle Gruppen besitzen und die sich zur Ausbildung von Netzwerken eignen, dem Reaktionsansatz zugeführt werden. Die dabei entstehenden Copolymere besitzen neben den gewünschten Eigenschaften noch die Fähigkeit zur Vernetzung. Die Netzwerkdicke kann dabei über die Menge an zugesetzten Funktionsmonomeren eingestellt werden.

2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung polymerer Netzwerke

In den folgenden Kapiteln wird auf die charakteristischen Eigenschaften von Polymeren und die Bestimmung dieser eingegangen.

2.2.1 Quellungsfaktor

Der Quellungsfaktor gibt bei polymeren Netzwerken Aufschluß über die Netzwerkdicke.^[PARK98] Ein geringes Quellungsverhalten entspricht einem dichten, engen Netzwerk, ein hohes Quellungsvermögen deutet auf ein weitmaschiges Netzwerk hin. Bindungsstellen im Polymer wirken als Rückstellkräfte der Quellung entgegen.

Bei der Quellung dringt Lösungsmittel bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes in das Netzwerk ein. Bei Erreichen des Gleichgewichts wird das Eindringvermögen von den Bindungskräften (Rückstellkräften) begrenzt.

Der Quellungsfaktor ist „dimensionslos [1]“ und wird nach folgender Formel berechnet:

$$q = \frac{W_q}{W_t} \quad [1]$$

Formel 2-1

Mit

q	Quellungsfaktor	[1]
W_q	Probengewicht in gequollenem Zustand	[g]
W_t	Probengewicht in trockenem Zustand	[g]

2.2.2 Wassergehalt

Eine andere Größe um Netzwerke zu charakterisieren ist die Angabe des Wassergehaltes.^[SENEL98] Diese Größe ist analog zum Quellungsfaktor, unter Verwendung von Wasser als Lösungsmittel.

Die Formel zur Berechnung des Wassergehaltes ist in der folgenden Gleichung gegeben:

$$W_g = \frac{w_q - w_t}{w_q} \cdot 100 \quad [\%]$$

Formel 2-2

mit

W_g	Wassergehalt	[%]
W_q	Probengewicht in gequollenem Zustand	[g]
W_t	Probengewicht in trockenem Zustand	[g]

2.2.3 Mechanische Eigenschaften

Mechanische Eigenschaften beschreiben den Zusammenhang zwischen Kraft und Dehnung bei mechanischer Verformung und zeigen, ob das Material elastische oder plastische Eigenschaften besitzt.

Nach Betrachtung der Reiß-Dehnungs-Kurven können Rückschlüsse über das viskoelastische Verhalten gewonnen werden. Ideal-elastische, isotrope Körper verformen sich unter Krafteinwirkung um einen von der Dauer der Belastung unabhängigen Betrag. Dabei sind einige Verformungsarten voneinander zu unterscheiden:

- Dehnung
- Scherung
- Kompression

- Stauchung
- Biegung
- Verdrillung
- Kombinationen der Verformungsarten

Beim Stab-Dehn-Versuch führt eine senkrecht zur Querschnittfläche wirkende Kraft zu einer Längenänderung des Probenmaterials in Abhängigkeit von der Zugspannung σ .

Die Dehnung (dimensionslos) ist

$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0} \quad [1]$$

Formel 2-3

mit

ε	Dehnung	[1]
L	Endlänge	[m]
L_0	Anfangslänge	[m]

Der auf die Ausgangslänge L_0 bezogene Längenunterschied ($L - L_0$) ist für ein isotropes, linear elastisches Material nach dem verallgemeinerten Hook'schen Gesetz proportional der einwirkenden Kraft bzw. der zu Vergleichszwecken auf eine Fläche bezogenen, mechanischen Spannung F/A (Zugspannung σ):

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

Formel 2-4

mit

σ	Spannung	[dyn/cm]
ε	Dehnung	[1]
E	E-Modul	[1]

Theoretischer Teil

Die Proportionalitätskonstante E ist eine Materialkenngröße und wird als E-Modul bezeichnet. Sie gibt an, in welchem Ausmaß eine angelegte Kraft eine Längenänderung hervorruft. Sie bildet das Verhältnis von Zugspannung zur Längsdehnung.

Die Berechnung des E-Moduls ist in der nachfolgenden Gleichung gezeigt:

$$E = \frac{\Delta F / A_0}{\Delta L / L_0}$$

Formel 2-5

Mit

E	E-Modul	[N/m]
ΔF	Kraftänderung	[1]
A_0	Querschnittsfläche Probenkörper	[m ²]
ΔL	Längenänderung	[m]
L_0	Anfangslänge	[m]

2.2.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Bei der Untersuchung von Werkstoffen besitzt die thermische Analyse einen besonderen Stellenwert. Niedermolekulare Substanzen ändern mit steigender Temperatur ihren Stoffzustand und gehen bei der Schmelztemperatur sichtbar vom Kristall in eine Flüssigkeit und bei der Siedetemperatur von der Flüssigkeit in ein Gas über. Jeder dieser Übergänge ist thermodynamisch durch eine sprunghafte Änderung der Enthalpie gekennzeichnet.

2.2.4.1 Glasübergangstemperatur

Amorphe Polymere sind unterhalb der Glasübergangstemperatur hart und spröde. Beim Glasübergang wird die begrenzte Beweglichkeit der Makromoleküle größer, das Polymer geht in einen viskoelastischen Zustand über. Oberhalb der Glasübergangstemperatur nimmt die Viskosität mit steigender Temperatur ab. Eine exakte Schmelztemperatur existiert bei Polymeren nicht.

Die Glasübergangstemperatur ist vom chemischen Aufbau und vom Polymerisationsgrad abhängig. Daneben haben auch Zusätze im Polymer, wie Weichmacher, Monomere, aber auch Feuchtigkeit, einen Einfluß auf die Glasübergangstemperatur. Außer Schmelz- und Glasübergangstemperaturen existieren noch weitere Umwandlungs- bzw. Relaxationstemperaturen. Da diese sich nicht immer sofort molekular deuten lassen, bezeichnet man oft den bei der höchsten Temperatur stattfindenden Übergang als α -Umwandlung, den nächst tieferen als β -Umwandlung.

Thermodynamische Zustände werden durch die Gibbs-Energie, bzw. deren erste Ableitung nach der Temperatur beschrieben. Die zweite Ableitung der Gibbs-Energie führt zur Wärmekapazität C_p (und ebenso zu dem kubischen Ausdehnungskoeffizienten α und der isothermen Kompressibilität κ). Die Gleichungen sind im folgenden für die freie Enthalpie gezeigt:

$$dG = dH - TdS$$

Formel 2-6

wobei die Entropie

$$dS = \left(\frac{\partial G}{\partial T} \right)_p$$

Formel 2-7

ist und die molare Wärmekapazität sich nach

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p$$

Formel 2-8

berechnet.

Es gilt:

$$C_p = T \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right)_p \text{ und nach Umformung } C_p = \left(\frac{\partial^2 G}{\partial T^2} \right)_p$$

Thermodynamische Umwandlungen lassen sich durch die entsprechenden Änderungen dieser Zustandsgrößen charakterisieren. Dabei unterscheidet man thermodynamische Umwandlungen 1. und 2. Ordnung. Beide Typen zeichnen sich durch thermodynamische Gleichgewichte zu beiden Seiten der physikalischen Umwandlung aus.^[HÖHNE03]

Thermodynamische Umwandlungen 1. Ordnung sind durch einen Sprung in der *ersten* Ableitung der Gibbs-Energie nach der Temperatur definiert; entsprechend zeigt auch die zweite Ableitung einen Sprung.

Eine charakteristische, thermodynamische Umwandlung 1. Ordnung ist das Schmelzen. Teilkristalline Polymere bleiben beim Erwärmen bis zum Schmelzen ihrer kristallinen Bereiche fest. Der Schmelzprozeß äußert sich als endothermer Peak in der DSC-Kurve. Als Schmelzpunkt wird die Temperatur beim Schmelzen der letzten Kristallite bezeichnet, das ist die Temperatur am Maximum des Peaks. Die Fläche darunter entspricht der Schmelzenthalpie der Probe.

Thermodynamische Umwandlungen 2. Ordnung sind dagegen durch das erstmalige Auftreten eines Sprunges bei der zweiten Ableitung der Gibbs-Energie nach der Temperatur definiert; die erste Ableitung und die Gibbs-Energie selbst verlaufen bei der Umwandlungstemperatur kontinuierlich.

Alle sicher bekannten, thermodynamischen Umwandlungen 2. Ordnung sind Einphasen-Umwandlungen, wie z. B. die Rotationsumwandlungen in Kristallen und das Verschwinden des Ferromagnetismus am Curie-Punkt.

Die Glasübergangstemperatur (T_g) hat den Charakter einer thermodynamischen Umwandlung 2. Ordnung. Es treten Diskontinuitäten bei C_p , α und κ auf. Sie ist jedoch keine echte thermodynamische Umwandlung, da kein Gleichgewicht zu beiden Seiten der Umwandlungstemperatur existiert. Die Lage der Glasübergangstemperatur hängt vielmehr von Einflüssen einiger Parameter ab, die hier kurz erläutert werden.

Die **Heiz-** bzw. **Kühlrate der Probe**: Je kleiner die Abkühlgeschwindigkeit, um so tiefer ist die Glasübergangstemperatur. (Auf die Heizrate und die Startpunkte einer Messung wird im Teil Material und Methoden eingegangen.)

Die **Beweglichkeit der Polymerkette**: Je größer der Substituent an der Hauptkette, bzw. je mehr die Rotation der Hauptkette eingeschränkt wird, desto höher ist die Glasübergangstemperatur.

Die **Länge der Seitenketten**: Je länger die Seitenkette, desto niedriger ist die Glasübergangstemperatur, da nur das erste Glied der Seitenkette die Rotation um die Hauptkette beeinträchtigt. Lange Seitenketten wirken wie zugesetzte Weichmacher.

Intermolekulare Kräfte: Intermolekulare Kräfte lassen die Glasübergangstemperatur steigen. Besonders starke Effekte beobachtet man bei Polymeren, die ionische Gruppen enthalten. Beispiele hierfür sind Alginat, Chitosan sowie die Hyaluronsäure.

Weichmacher: Weichmacher (z.B. Restmonomere, Lösungsmittel, etc.) führen in der Regel zu einer Absenkung der Glasübergangstemperatur. Interessant ist in diesem Zusammenhang der T_g -Wert von Block-Copolymeren, bei denen sich die Gesamt- T_g aus den beiden einzelnen T_g -Werten mittelt. Liegen hingegen Mischungen von Polymeren vor, so sind unter Umständen zwei T_g -Werte zu beobachten, wie nachfolgend beschrieben wird.

Druck: Mit steigendem Druck steigt auch die Glasübergangstemperatur (ca. 20 K pro 1000 bar).

Molekulargewicht: Die Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur vom Molekulargewicht läßt sich durch die folgende Gleichung beschreiben:

$$T_g(M) = T_g(\infty) - \left(\frac{K}{M} \right)$$

Formel 2-11

Mit

T_g	Glasübergangstemperatur	[K]
M	Molekulargewicht	[g/mol]
K	Konstante	[mol*K/g]

Die Glasübergangstemperatur verhält sich also umgekehrt proportional zur Molmasse. Bei den zu untersuchenden Polymeren wird angenommen, daß bei den hohen Molmassen dieser Polymere die Glasübergangstemperatur praktisch konstant ist.

Comonomere: Die Einführung von Comonomeren in das Polymer führt zu einer Beeinflussung der Glasübergangstemperatur. Im Normalfall hat ein Copolymer mit statistischer Zusammensetzung zweier Monomere eine Glasübergangstemperatur, welche zwischen den beiden Glasübergangstemperaturen der entsprechenden Homopolymere liegt. Im Idealfall findet sich eine sehr einfache Beziehung zwischen der Glasübergangstemperatur und der Comonomerkonzentration im Polymer, wie sie z. B. mit der linearen Gordon-Taylor-Gleichung beschrieben werden kann:

$$\left(\frac{1}{T_g} \right) = \left(\frac{W_1}{T_{g1}} \right) + \left(\frac{W_2}{T_{g2}} \right)$$

Formel 2-12

Mit

$T_{g(1/2)}$	Glasübergangstemperatur (gesamt, Monomer1, Monomer2)[]
W_1/W_2	Massenbruch des jeweiligen Comonomers bezogen auf den Gesamtmonomergehalt [1]

Im nicht idealen Fall beobachtet man zum Teil höhere, aber auch niedrigere Glasübergangstemperaturen, als die der entsprechenden Zusammensetzung der Homopolymere. Beispielsweise weicht im Fall des Ethen/Acrylnitril-Copolymers die Glasübergangstemperatur bei Gehalten kleiner 50 Gew.-% Acrylnitril von der linearen Beziehung zwischen Polyethylen und Polyacrylnitril ab. Das Abweichen von der linearen Gordon-Taylor-Beziehung kann mit der Kristallisation von Ethen-Sequenzen bei niedrigen Gehalten kristallisationsstörender Comonomere erklärt werden.

Liegt keine statistische Verteilung der Monomereinheiten im Polymer vor, handelt es sich z. B. um Block-Copolymere oder Polymerblends, beobachtet man zum Teil auch zwei Glasübergänge.

2.2.4.2 Grundlagen der Wärmefluß-DSC

Probe- und Referenztiegel befinden sich gemeinsam in einem Ofen, der einem definierten Temperatur-Zeit-Programm unterworfen ist. In der Regel wird mit konstanten Heiz- oder Kühlraten gearbeitet. Das gemessene Signal ist die Temperaturdifferenz ΔT zwischen Probe S und Referenz R als Funktion der

Ofentemperatur $T(t)$. ΔT ist proportional zum Wärmestrom Q_s zur Probe. Der Wärmestrom Q_s setzt sich additiv aus den Wärmeströmen vom Ofen und der Referenz zur Probe zusammen:

2.2.4.3 Ermittlung der Porengrößenverteilung durch Thermoporosimetrie

Bei biomedizinischen Anwendungen ist oft die Kenntnis von Porengrößen und auch der Porengrößenverteilung entscheidend. In der Einleitung wurden schon Rahmenbedingungen genannt, die an das Material gestellt werden.

Bei der Anwendung als Zellcontainer müssen die Poren so gestaltet werden, daß die Diffusionseigenschaften durch die Wand so günstig sind, daß die gewählten Zellen lebensfähig bleiben:

Nährstoffe und Wachstumsfaktoren müssen zu den Zellen gelangen, und Stoffwechselprodukte sollen den Container verlassen können. Gleichzeitig soll die Diffusionsbarriere groß genug sein, um die Zellen der Immunantwort des Körpers zu entziehen.

Bei einem Drug-Release-System sind die an das Material, insbesondere an die Porengrößen, gestellten Anforderungen etwas anders gelagert. Aufgabe eines solchen Materials ist die zielgerichtete Abgabe von Wirkstoffen über einen durch medizinische Indikation festgelegten Zeitraum. Die Freisetzung erfolgt durch die Poren und durch das Abbauverhalten des Materials am Implantationsort in medizinisch sinnvoller Weise.

Das Material soll die Wirkstoffe abgeben und sich gleichmäßig abbauen, um das umgebende Gewebe nicht mit Abbauprodukten zu überlasten (tissue overload).

Prinzipiell können zwei Wirkstoffanbindungen an die Matrix unterschieden werden. Der Wirkstoff kann als Host-Guest-System in der Matrix ohne kovalente Bindungen eingeschlossen sein, oder er kann kovalent an die Matrix angekoppelt sein.

Bei der Host-Guest-Methode wird der Wirkstoff über Diffusion aus der Matrix entlassen bzw. über den Abbau der Matrix.

Bei der kovalenten Anbindung wird der Wirkstoff über die Zersetzungskinetik der gewählten Verbindung zur Matrix freigesetzt. Je nach Bindungstyp kann hier eine verzögerte und auch dauerhaftere Medikamentenabgabe realisiert werden.

Die klassischen Methoden zur Ermittlung der Porengrößenverteilung sind die Gasadsorption und die Quecksilber-Porosimetrie. Beide Verfahren besitzen, wie auch die im folgenden erwähnte Elektronenmikroskopie, den Nachteil, daß die Porengrößenverteilung im ungequollenen, trockenen Zustand gemessen wird. Gerade bei der vorliegenden Anwendung interessieren jedoch nur die Eigenschaften im gequollenen Zustand.

Die Thermoporosimetrie^{[IZA00],[HÖHNE03],[FAIVRE99]} bietet die Möglichkeit, Proben in gequollenem Zustand zu vermessen und die Porengrößen zu ermitteln, wie sie auch später am Implantationsort vorliegen. Die Grundlage für die Messung der Porengrößenverteilung mittels Thermoporosimetrie ist die Schmelzpunktdepression eines die Poren füllenden Stoffes. Der Zusammenhang zwischen dem Porendurchmesser D und der Schmelzpunktdepression ΔT_m wird durch die Gibbs-Thomson-Gleichung beschrieben:

$$\Delta T = -\alpha \cdot T_m^0 \cdot \frac{\sigma_{sl}}{r} \frac{V_s}{\Delta_m H}$$

Formel 2-13

mit

$\Delta T = (T_m^0 - T)$	Schmelzpunktdepression der flüssigen Phase (Wasser)	[K]
α	geometrischer Faktor, der die Konformation der Poren berücksichtigt (für sphärische Poren ist $\alpha=2$) ^[FAIVRE99]	[1]
σ_{sl}	Grenzflächenenergie (Oberflächenenergie) zwischen fester und flüssiger Phase	[mN/m]
V_s	Molvolumen	[m ³ /mol]
T	Schmelzpunkt des Adsorbats	[K]
$\Delta_m H$	Schmelzwärme	[kJ/mol]

Für den Porendurchmesser folgt nach einfachen Umformungen über

$$d = 2 \cdot r$$

Formel 2-14

und

$$\alpha = -2$$

Formel 2-15

der Ausdruck:

$$d = \frac{4 \cdot V_s \cdot T \cdot \sigma_{sl}}{\Delta_m H \cdot \Delta T_m}$$

Formel 2-16

Als Adsorbat können fast beliebige Substanzen verwendet werden. Wasser ist eine besonders brauchbare Substanz, um die Poren zu füllen, nicht zuletzt wegen des Schmelzpunktes in einem praktischen Temperaturbereich.

Für Wasser ist:

$$V_s = 19,6 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{mol}$$

$$T = 273,14 \text{ K}$$

$$\Delta H_m = 6,02 \text{ kJ/mol}$$

$$\sigma_{ls} = 12,1 \text{ mN/m (Molsieb } 3 \text{ \AA)}$$

σ_{ls} wurde ermittelt, indem die Schmelzpunktdepression von Molsieb mit genau bekannter Porengröße (Referenzsubstanz) mit DSC gemessen wurde.

Der Zusammenhang zwischen Porengröße und Schmelzpunktdepression vereinfacht sich somit zu:

$$d[\text{nm}] = \frac{40,3}{\Delta T_m}$$

Formel 2-17

Die Porengröße läßt sich bei diesem Verfahren nur relativ angeben. Das kann für eine prozeßbegleitende Analyse ausreichend sein, für eine Absolutbestimmung muß die Grenzflächenenergie (σ_{ls}) des vorliegenden Systems bekannt sein. Nachfolgend

ist eine Methode beschrieben, mit deren Hilfe sich die Grenzflächenenergie ermitteln läßt, um so auch Absolutwerte der Porengröße zu erhalten.

2.3 Funktionalisierung von Oberflächen

2.3.1 Ermittlung der Grenzflächenenergie durch Bestimmung der Kontaktwinkel

Die Bestimmung der Oberflächenspannung beruht auf der Erkenntnis von Young, daß sich das Kräftegleichgewicht am Rande eines liegenden Tropfens durch die Grenzflächenenergien der jeweiligen Grenzflächen beschreiben läßt.

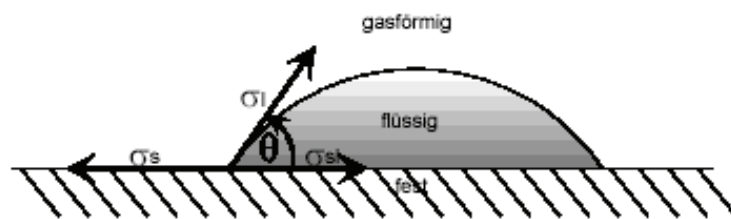


Abbildung 2-16:

Es gilt:

$$\sigma_s = \sigma_{ls} + \sigma_l \cos \theta$$

Formel 2-18

mit

σ_s	Oberflächenspannung zwischen Festkörper und gesättigtem Dampf der Flüssigkeit	[N/m]
σ_{ls}	Oberflächenspannung zwischen Tropfen und Festkörper	[N/m]
σ_l	Oberflächenspannung des Tropfens gegenüber dem gesättigten Dampf der Flüssigkeit	[N/m]

θ Benetzungs- oder Kontaktwinkel [°]

Die Oberflächenspannung wurde gemäß der *Owens-Wendt-Rabel-Kaelble-Methode (OWRK-Methode)* bestimmt, die eine Differenzierung in einen polaren und einen dispersen Teil erlaubt. Unter polaren Wechselwirkungen werden die Coulombwechselwirkungen zwischen permanenten und induzierten Dipolen zusammengefaßt. Disperse Wechselwirkungen entstehen aufgrund von zeitlichen Fluktuationen der Ladungsverteilung innerhalb der Moleküle. Polarer und disperser Anteil der Oberflächenspannung setzen sich additiv zusammen. Es gilt:

$$\sigma_l = \sigma_l^d + \sigma_l^p$$

Formel 2-19

$$\sigma_s = \sigma_s^d + \sigma_s^p$$

Formel 2-20

mit

σ_l^d, σ_l^p disperser und polarer Anteil der Oberflächenspannung der Flüssigkeit [N/m]

σ_s^d, σ_s^p disperser und polarer Anteil der Oberflächenspannung des Festkörpers [N/m]

Die Grenzflächenenergie σ_{ls} läßt sich aus dem Anteil der Flüssigkeit und des Festkörpers durch die Bildung des geometrischen Mittels berechnen:

$$\sigma_{ls} = \sigma_s + \sigma_l - 2(\sqrt{\sigma_s^d \sigma_l^d} + \sqrt{\sigma_s^p \sigma_l^p})$$

Formel 2-21

Die Young'sche Gleichung und die geometrische Mittelung führen zu einem Gleichungssystem, daß gelöst werden kann, wenn die polaren und dispersen Oberflächenspannungen, sowie die Kontaktwinkel zweier verschiedener Flüssigkeiten auf dem Festkörper bekannt sind:

$$\sqrt{\sigma_s^d \sigma_l^{d1}} + \sqrt{\sigma_s^p \sigma_l^{p1}} = \frac{\sigma_l^1}{2} (1 + \cos \theta_1)$$

$$\sqrt{\sigma_s^d \sigma_l^{d2}} + \sqrt{\sigma_s^p \sigma_l^{p2}} = \frac{\sigma_l^2}{2} (1 + \cos \theta_2)$$

Formel 2-22; Formel 2-23

Nach einigen Umformungen ergibt sich für den polaren und den dispersen Anteil der Oberflächenspannung des Festkörpers:

$$\sigma_s^p = \left[\frac{\frac{\sigma_l^2}{2} (1 + \cos \theta_2) - \sqrt{\frac{\sigma_l^{d2}}{\sigma_l^{d1}}} \frac{\sigma_l^1}{2} (1 + \cos \theta_1)}{\sqrt{\sigma_l^{p2}} - \sqrt{\frac{\sigma_l^{d2} \sigma_l^{p1}}{\sigma_l^{d1}}}} \right]^2$$

$$\sigma_s^d = \frac{1}{\sigma_l^{d1}} \left(\frac{\sigma_l^1}{2} (1 + \cos \theta_1) - \sqrt{\sigma_s^p \sigma_l^{p1}} \right)^2$$

Formel 2-24; Formel 2-25

Die Oberflächenspannungen der Testflüssigkeiten sind aus der folgenden Tabelle zu entnehmen. Aufgeführt sind die gebräuchlichsten Substanzen.

Tabelle 2-1: Oberflächenspannung unterschiedlicher Lösungsmittel

[mN/m]	Wasser	Glyzerin	Formamid	Methylen- iodid	Ethylen- glykol
σ	72,8	64,0	58,0	50,8	48,0
σ_{polar}	51,0	30,0	19,0	0,0	19,0
σ_{dispers}	21,8	34,0	39,0	50,8	29,0

Diese Methode kann keine Aussagen über die Struktur der Poren geben. Über den geometrischen Faktor (α) wird schon eine Annahme getroffen, die aber aus REM-Aufnahmen des Materials gerechtfertigt erscheint.

Die Vorgehensweise, nach der sich die Grenzflächenenergie σ_{ls} aus dem Anteil der Flüssigkeit und des Festkörpers durch die Bildung des geometrischen Mittels berechnen lässt, ist ebenfalls eine Vereinfachung.

2.3.2 Plasmabehandlung

Die Funktionalisierung von Oberflächen führt bei Beschichtungsaufgaben meist zu besseren Resultaten. Ein leistungsfähiges Verfahren, die Plasmabehandlung, soll an dieser Stelle genauer beschrieben werden.

2.3.2.1 Plasma und Oberflächen

Unter einem Plasma, auch der vierte Aggregatzustand genannt, versteht man ein (teil-) ionisiertes Gas, in dem neben neutralen Gasmolekülen und Molekülfragmenten auch freie Elektronen und Kationen vorkommen, und welches somit leitend ist. Hinzu kommt eine große Anzahl angeregter Molekülzustände, die unter Abgabe von elektromagnetischer Strahlung zum Grundzustand zurückkehren, was zum charakteristischen Leuchten des Plasmas führt.^{[KUZUYA01],[GUERIN02],[LAPPAN01]}

Die bei der Entstehung eines Plasmas benötigte Energie kann sehr unterschiedliche Quellen haben. So kommen in der Natur Plasmen z.B. auf der Sonne vor, sowie in Blitzen und Flammen, aber auch in den als Nordlicht bezeichneten, atmosphärischen Phänomenen. Die weitaus häufigste Art der technischen Erzeugung von Plasmen ist die gezielte Einstrahlung von elektrischen Feldern.

Je nach verwendeter Frequenz unterscheidet man dabei zwischen Wechselstrom (50 Hz), Audio (KHz)-, Radio (MHz)-Frequenz oder Mikrowellenplasmen (GHz). Technisch genutzt werden Plasmen z.B. in Leuchtstoffröhren und in jüngerer Zeit vor allem in der Oberflächentechnik.

Eine gängige Unterscheidung von Plasmen ist die Aufteilung in heiße (thermische) und kalte (nichtthermische) Plasmen.

Bei thermischen Plasmen ist der Druck des Gases relativ hoch, was die Anzahl der Zusammenstöße zwischen den Teilchen (neutrale, geladene, angeregte, nicht angeregte) erhöht und damit die Übertragung der Energie zwischen ihnen begünstigt. Das Ergebnis ist ein Plasma, das sich im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, in dem also alle Teilchen annähernd die gleiche hohe Energie aufweisen, was als "heiß" bezeichnet wird.

Nichtthermische Plasmen entstehen bei reduzierten Drücken (ca. $1 - 10^4$ Pa). Hier ist die mittlere freie Weglänge so groß, daß außer durch Elektronenstöße keine nennenswerte Energieübertragung zwischen den Teilchen stattfinden kann, es entsteht also kein thermisches Gleichgewicht. Makroskopisch betrachtet liegt das System bei Raumtemperatur, enthält aber einen gewissen Anteil an Teilchen, nämlich Elektronen, die sehr hohe Energien (Temperaturen) aufweisen (bis zu 10^5 °C). Diese energiereichen Elektronen und die energiereiche Strahlung von Elektronenübergängen sind zur Induktion von chemischen Reaktionen an Oberflächen bzw. in oberflächennahen Bereichen befähigt, die selbst die Modifizierung stabiler, chemischer Strukturen beinhalten kann. Gleichzeitig findet keine thermische Belastung dieser Oberfläche statt, da die makroskopische Temperatur der Umgebung angepaßt ist.

Für die Oberflächenmodifizierung eignet sich sowohl die Niederdruck-Plasmatechnik, als auch die Atmosphärendruck-Plasmatechnik. Prinzipiell sind die dabei an der Oberfläche ablaufenden Prozesse stets dieselben, wobei sich die mit einem Plasma auf einer Substratoberfläche erzielbaren Effekte in die Kategorien

- Reinigung
- Aktivierung
- Beschichtung

einteilen lassen.

Bei der Reinigung von Substratoberflächen (Polymer, Metall, Glas, Keramik) im Plasma geht es zumeist um die Entfernung kleiner Reste von organischen Substanzen, im Anschluß an eine, mit einem anderen Verfahren durchgeführte Grobreinigung. Eine derartige Feinreinigung wird erreicht, indem die Oberfläche z.B.

einem Sauerstoffplasma ausgesetzt wird, wobei die zu entfernende, organische Substanz sich, ähnlich wie bei einer Verbrennung, mit dem O_2 verbindet. Grobe Verschmutzungen können im Plasma nicht auf wirtschaftlichem Weg entfernt werden.

Im Falle der Aktivierung wird z.B. eine polymere Oberfläche einem Plasma ausgesetzt, das entweder aus inerten Gasen (Edelgasen) oder aus Molekülen, die keine zur Kettenbildung befähigten Atome enthalten (z.B. N_2 , O_2 , NH_3), besteht.^[LAPPAN01] Dabei werden, durch die im Plasma erzeugten, energiereichen Spezies, überwiegend Elektronen, energiereiche Strahlung, aber auch Ionen und angeregte Spezies, in der Oberfläche Bindungen gebrochen und reaktive Stellen erzeugt. Diese reaktiven Stellen (Radikale) können daraufhin miteinander reagieren und eine zusätzliche Vernetzung in der Oberflächenregion zur Folge haben. Zum Teil bleiben sie aber auch in der entstehenden, höher vernetzten Oberfläche erhalten und ergeben so eine aktivierte Oberfläche, die spontan zu Folgereaktionen, z.B. mit Luftsauerstoff, befähigt ist. Bei Gasen, die keine Edelgase sind, wie N_2 , O_2 oder NH_3 , können die in ihnen enthaltenen Atome zusätzlich in die Oberfläche eingebaut werden und so eine Veränderung der Oberflächeneigenschaften des Kunststoffs durch den Einbau neuer funktioneller Gruppen bewirken.^{[MASON00, [LAHANN01]}

In der folgenden Abbildung wird dieser Effekt anhand eines Beispiels dargestellt.

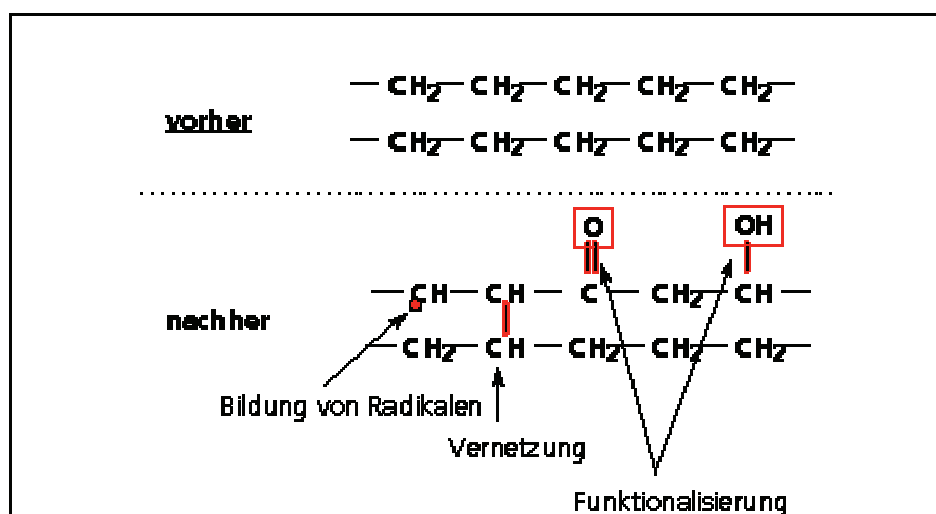


Abbildung 2-17: Effekt eines Sauerstoffplasmas auf eine Polyethylenoberfläche

Die Polyethylenoberfläche enthält nach einer Behandlung im O₂-Plasma Carbonyl-, Hydroxyl- und andere sauerstoffhaltige, funktionelle Gruppen.

Eigenschaften wie Verklebbarkeit, Haftung von Lacken, Benetzbarkeit und Oberflächenenergie können durch diese Behandlung gezielt verändert werden.

Im Gegensatz dazu wird bei einer Beschichtung Material aus der Gasphase auf das Substrat in einer Schichtdicke von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern aufgebracht. Es gibt eine Vielzahl an plasmagestützten Beschichtungsverfahren, wie z.B. die Kathodenzerstäubung ("sputtern"), PECVD ("plasma enhanced chemical vapor deposition") und die Plasmapolymerisation.

2.3.2.2 Plasmaanlage und Behandlungsprozeß

Das Hauptstück einer Plasmaanlage ist der Rezipient, der mit Hilfe einer Vakuumpumpe evakuiert werden kann. Über Ventile kann kontrolliert Gas in die Kammer geleitet werden, das bei niedrigem Druck durch Einstrahlen von Mikrowellen mittels eines Hochfrequenzgenerators gezündet wird. Die zu behandelnden Proben können entweder auf die Elektrode (aktive Seite) oder auf die dafür vorgesehene Halterung (passive Seite) gelegt werden.

Im folgenden sind der schematische Aufbau einer Plasmaanlage und die in dieser Arbeit verwandte Plasmaanlage gezeigt.

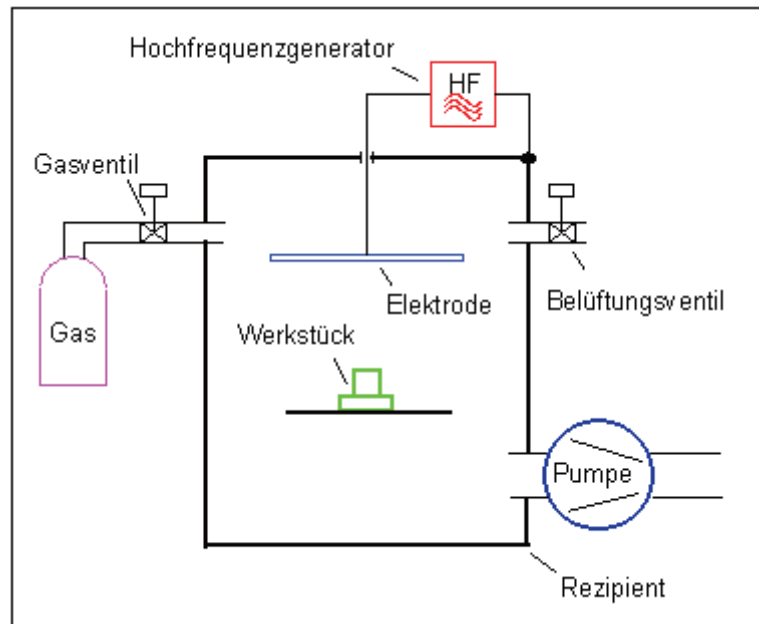


Abbildung 2-18: Schematische Darstellung einer Plasmaanlage

In Abbildung 2-18 ist der prinzipielle Aufbau einer Plasmaanlage, bestehend aus dem evakuierbaren Rezipienten, der Elektrode und der Synthesegaszuführung, gezeigt. In dem abgebildeten Schema wird eine Hochfrequenz eingekoppelt. Das zu beschichtende Werkstück liegt in diesem Bild auf der Passivseite. Die Behandlung kann aber auch auf der Aktivseite (Sendelektrode) geschehen.



Abbildung 2-19: Plasmaanlage (Leistung bis zu 200 W)

Die gezeigte Anlage wurde von der Fa. Diener Electronics hergestellt. Sie ermöglicht es, den Rezipienten mit zwei Synthesegasen zu betreiben, wobei der Fluß der Gase durch ein Rotameter eingestellt werden kann. Die Anlage arbeitet mit 40 kHz, wobei

die Leistung über ein Zehn-Schritt-Potentiometer zwischen 0 und 200 W eingestellt werden kann. Die Anlage verfügt zur weiteren Kontrolle über einen Drucksensor.

Der Plasmabehandlungsprozeß läuft immer nach einem festen Grundschemata ab. Dieses ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

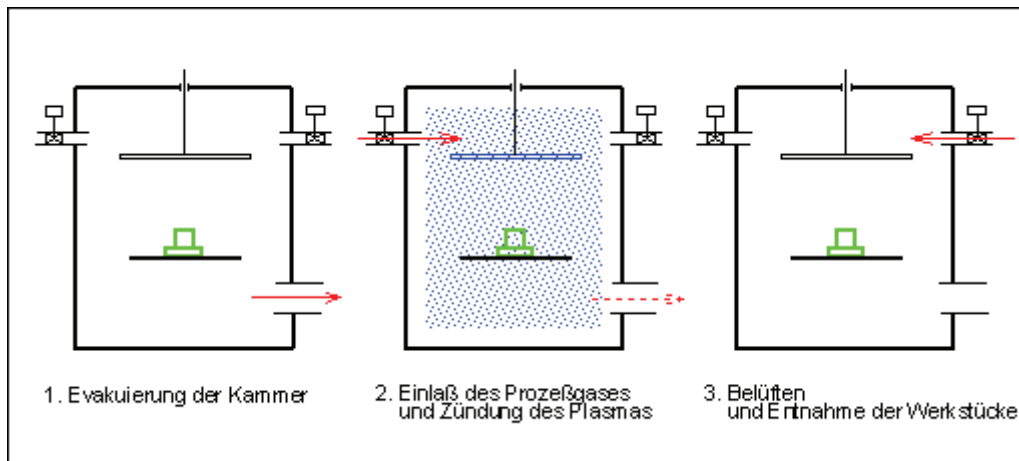


Abbildung 2-20: Prozeßablauf der Plasmabehandlung

Nachdem die Kammer evakuiert und mehrere Minuten mit Gas gespült worden ist, wird das Plasma gezündet. Die Dauer der Exposition, der Gasdruck und die Leistung des Generators können am Gerät eingestellt werden. Nach der Behandlung wird die Kammer über ein Belüftungsventil auf Normaldruck gebracht, und die Proben werden entnommen.

2.3.3 Chemische Haftvermittler auf Silanbasis

Neben den plasmatechnischen Methoden zur Haftvermittlung von Polymeren auf Substraten sind auch naßchemische Methoden einsetzbar.^{[PRUCKER99],[ELENDER96]}

Die Ethoxysilane und die Methoxysilane sind geeignete Haftvermittler. Sie besitzen neben den auch sehr gebräuchlichen Halogensilanen (Chlorsilanen) den Vorteil, nicht so empfindlich auf Feuchtigkeit zu reagieren. Bedingung für diesen Reaktionsweg ist das Vorhandensein von oberflächengebundenen OH-Gruppen. Durch die Methoxy- oder Ethoxysilane können Glas und viele Metalle, die in der Lage

sind, basische Oxide zu bilden, wie z. B. Aluminium, Eisen und Titan, derivatisiert werden. Kunststoffe und auch Siliziumcarbidoberflächen müssen vorher durch geeignete Methoden behandelt werden, um die OH-Gruppen zu erhalten. Dazu eignet sich das im vorherigen Kapitel beschriebene Verfahren der Plasmatechnik. Der schematische Aufbau einer funktionalisierten Oberfläche ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

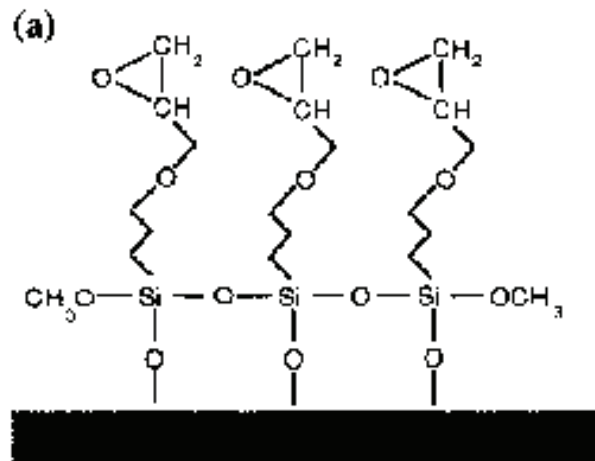


Abbildung 2-21: Funktionalisierung einer Oberfläche mit einem Trimethoxyepoxisilan

Anstelle der Methoxyverbindungen können auch Ethoxyverbindungen zum Einsatz kommen, und anstatt der Epoxygruppe können auch Aminendgruppen eingesetzt werden, um chemische Bindungsstellen bereitzustellen. Über diesen Weg können dann Polymere oder generell Substanzen an Oberflächen kovalent gebunden werden.

2.3.4 Ellipsometrie

Licht, das von natürlichen Lichtquellen ausgeht, verhält sich um seine Fortpflanzungsrichtung vollkommen symmetrisch. Das bedeutet, daß es keinerlei „Seitlichkeit“ zeigt, wie es zum Beispiel Transversalwellen im Vergleich zu Longitudinalwellen haben.

Ein Versuch des Physikers E. L. Malus aus dem Jahr 1808 zeigte jedoch, daß Licht unter bestimmten Bedingungen sehr wohl eine „Seitlichkeit“ aufweist. Diese Eigenschaft wird Polarisation genannt.

2.3.4.1 Polarisation des Lichts

Vereinfacht läßt sich der Versuch durch die folgenden Abbildungen darstellen:

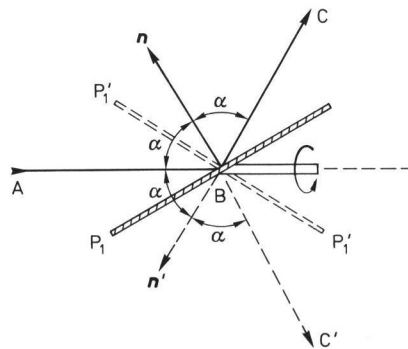


Abbildung 2-22: Reflexion des Lichtes an einer Glasplatte

Ein natürlicher Lichtstrahl mit der Richtung AB fällt unter einem beliebigen Winkel α auf eine schwarze Glasplatte P1. An der Vorderseite der Glasplatte wird der Strahl in Richtung BC reflektiert. Die Punkte A, B und C liegen zunächst alle in der Zeichenebene. Dreht man P1 nun um die Achse AB, dann verläßt der reflektierte Strahl BC die Zeichenebene und wird zu BC'. Aber egal wie man die Glasplatte und damit die Einfallsebene um die Zeichenebene dreht, der Strahl wird immer unter dem gleichen Winkel α und mit der gleichen Intensität reflektiert.

Erweitert man die Anordnung nun um eine weitere Glasplatte P2, kommt man zu folgendem Versuchsaufbau.

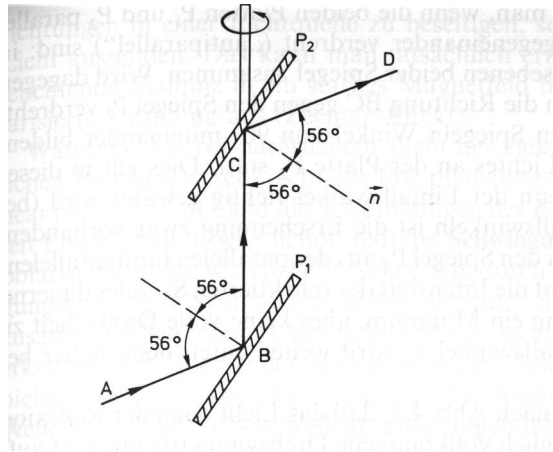


Abbildung 2-23: Nachweis der Polarisation des Lichtes durch Spiegelung an zwei Glasplatten

Hier wird der reflektierte Strahl BC durch die Platte P2 in die Richtung CD weiterreflektiert. Man stellt nun den Einfallswinkel beider Platten nicht mehr beliebig zueinander ein, sondern auf einen bestimmten Winkel α_p , der bei Glas ca. 56° beträgt. Solange P1 und P2 parallel zueinander sind, befinden sich die Strahlen AB, BC und CD alle in derselben Ebene, der Zeichenebene. Nun wird die Platte P2 um BC gedreht, so daß der Einfallswinkel jedoch noch immer α_p entspricht. Dadurch verläßt der zweifach reflektierte Strahl CD die Zeichenebene. Wäre der Strahl BC noch ein natürlicher Strahl, der vollkommen symmetrisch ist, müßte der Strahl CD auch noch unter dem gleichen Winkel und mit der gleichen Intensität reflektiert werden. Dies ist jedoch nicht der Fall. Zwar bleibt der Winkel bestehen, die Intensität ändert sich jedoch. Hat man den Einfallswinkel α_p dem Material entsprechend gewählt, und ist P2 um 90° bzw. 270° um BC gedreht worden, so daß die Einfallsebenen der beiden Platten senkrecht zueinander sind, wird der Strahl BC an P2 überhaupt nicht reflektiert, die Intensität des Strahls CD ist also Null. Den Winkel α_p eines Materials, bei dem diese totale Auslöschung auftritt, nennt man Polarisationwinkel.

α_p ist materialabhängig und ergibt sich aus dem Brechungsindex n nach der Formel

$$\tan \alpha_p = n$$

Formel 2-26

Das natürliche Licht zeigt also nach der Reflexion an einer Glasplatte „seitliche“ Eigenschaften.

Man nennt solches Licht, das durch eine bestimmte Schwingungsrichtung senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung ausgezeichnet ist, linear polarisiert. Die Vorrichtung, mit der das Licht polarisiert wird, heißt Polarisator.

Bei natürlichem Licht schwingt der elektrische Feldvektor E in allen möglichen Richtungen senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung, daher scheint es vollkommen symmetrisch zu sein. Bei linear polarisiertem Licht teilen sich die Schwingungen des Feldvektors E in zwei Schwingungsebenen auf, eine senkrecht zur Einfallsebene (E_{\perp}), die andere parallel zur Einfallsebene (E_{\parallel}). An der zweiten Platte reflektiert wird nur der Anteil E_{\perp} , E_{\parallel} wird vollständig durchgelassen.

Die Polarisations-eigenschaft des Lichtes wird bei der ellipsometrischen Messung ausgenutzt.

2.3.4.2 Ellipsometrische Messungen

Es werden zwei Arten der ellipsometrischen Messung unterschieden.^[Roc96]

- Nullellipsometrie
- Photometrische Ellipsometrie

Das in dieser Arbeit verwandte Gerät arbeitet nach dem Prinzip der Nullellipsometrie. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit nur dieses Meßprinzip vorgestellt und für die photometrische Ellipsometrie lediglich auf Lehrbücher der Physik verwiesen.

Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Ellipsometers nach dem Prinzip der Nullellipsometrie.

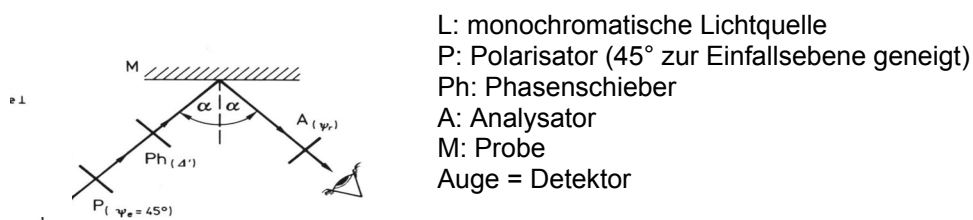


Abbildung 2-24: Schematischer Aufbau eines Ellipsometers

Das monochromatische, parallele Licht gelangt durch den Polarisator P auf die spiegelnde Oberfläche der Probe M. Der Polarisator hat dabei einen Winkel von $\Psi_e = 45^\circ$ gegen die Einfallsebene. Zwischen P und M ist ein Phasenschieber angebracht. Damit kann man den beiden Komponenten E_\perp und E_\parallel eine beliebig einstellbare Phasendifferenz erteilen. Ziel ist es, die bei der Reflexion entstehende Phasenverschiebung zu kompensieren, so daß auf der Beobachtungsseite linear polarisiertes Licht erhalten wird. Die Stellung des Analysators, in der am Detektor die Auslöschung auftritt, liefert dann den Winkel Ψ_r .

Mit Hilfe der beiden Winkel Δ' und Ψ_r läßt sich die Schichtdicke einer dünnen Oberflächenschicht bestimmen.

Sind Ψ_{r0} und Δ'_0 die Meßwerte an einer vollkommen sauberen Oberfläche, und ist d die Schichtdicke einer fremden Oberflächenschicht, so läßt sich die dadurch hervorgerufene Störung durch die linearen Terme der Potenzreihensätze

$$\Delta' = \Delta'_0 + \gamma_1 d + \dots \quad \text{und} \quad \Psi_r = \Psi_{r0} + \gamma_2 d + \dots$$

Formel 2-27, Formel 2-28

erfassen. Die Koeffizienten γ_1 und γ_2 sind Funktionen der beteiligten optischen Komponenten sowie des Einfallswinkels und sind somit bekannt.

2.3.4.3 Das Ellipsometer

Das Einwellenlängen-Ellipsometer EL X-1 der Firma Dr. Riss Ellipsometerbau (DRE) (Abbildung 2-25) dient zur Bestimmung der komplexen Brechzahl oder der Höhe dünner Schichten auf Oberflächen.

Das Prinzip der Ellipsometrie beruht auf dem physikalischen Effekt der Änderung des Polarisationszustandes (Orientierung, Elliptizität) von polarisiertem Licht durch Reflexion.

Die Meßwellenlänge $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ wird durch einen stabilisierten Helium-Neon-Laser erzeugt. Das System verfügt über eine Justierhilfe zur Probenausrichtung. Diese erfolgt über die Prüfung der Intensitätsverteilung auf einer Vier-Quadranten-Diode. Trifft auf alle vier Quadranten die gleiche Lichtmenge, so ist die Probe optimal

ausgerichtet. Zur Unterstützung der Justierung erhält man grafische Hinweise über die momentane Abweichung. Der Einfallswinkel ist in 5°-Schritten zwischen 30° und 90° wählbar.

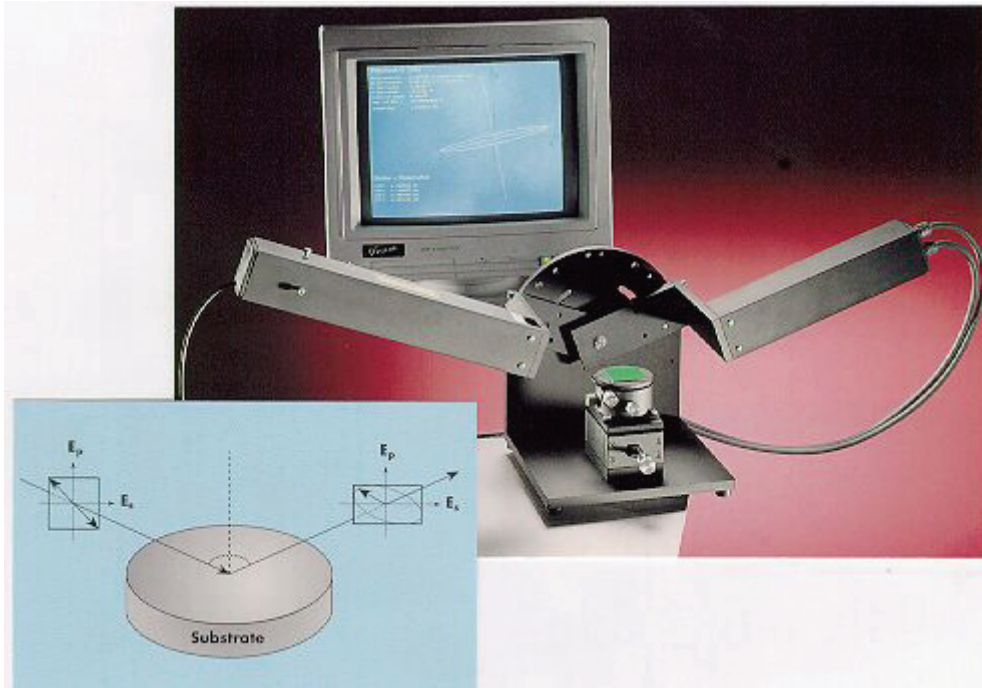


Abbildung 2-25: Einwellenlängen-Ellipsometer EL X-1

Die Messung erfolgt entweder als Einzel- oder Mehrfachmessung mit entsprechender Bildung von Mittelwert und Standardabweichung. Es stehen sechs verschiedene, in ihrer Genauigkeit abgestufte Meßalgorithmen zur Verfügung. Drei basieren auf einer harmonischen Analyse (standard, advanced und high precision harmonic analysis) und drei auf der Minimumsuche (precision, high precision und very high precision minimum search), wobei die Suche nach dem Minimum prinzipiell genauer ist.

Die berechneten Werte für $\tan\Psi$ und Δ werden mit dem Programm ANISO ausgewertet, das harmonische Lösungen für die Schichtdicken und die komplexe Brechzahl der Oberfläche berechnet. Aus diesen Lösungen müssen dann die physikalisch sinnvollen Werte ermittelt werden.

2.3.5 Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscope, AFM)

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird die Probenoberfläche mit einer feinen Nadel, die sich am freien Ende eines Hebelarms (Cantilever) befindet, rasterförmig abgetastet.

Im Contact-Mode befindet sich die Nadel in direktem Kontakt mit der Probe, also im repulsiven Bereich des Wechselwirkungspotentials (Lenard-Jones-Potential).

Im Non-Contact-Mode wird die Nadel berührungslos über die Probe geführt, wobei die attraktiven Van-der-Waals-Kräfte wirksam sind.

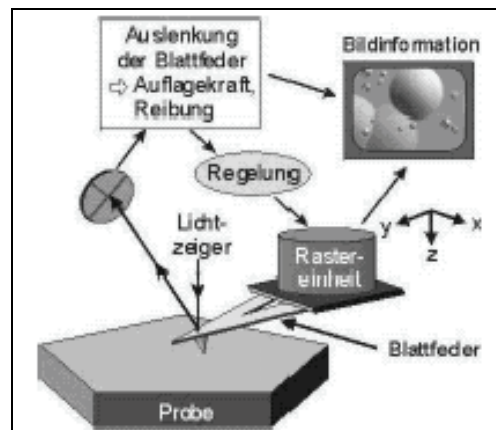


Abbildung 2-26: Prinzip des AFM

Beim Rastern wird die Probe durch eine xyz-Piezokeramik (Zwei- bzw. Vierquadrantenröhrchen) bewegt, während die Tastspitze fixiert ist. Die Auslenkung des Hebelarms in der z-Achse entspricht der Topographie der Probenoberfläche, sie dient als Meßsignal und wird optisch detektiert. Dazu wird ein Laserstrahl auf das freie Ende des Cantilever justiert und der reflektierte Strahl wird über eine Vierfeld-Differenzphotodiode ortsauflösend detektiert. Dabei werden zwei Methoden unterschieden.

Im Constant-Force-Mode wird die Cantileverauslenkung und damit das Potential an der Photodiode konstant gehalten, indem die z-Koordinate der Probe über eine Rückkopplungsschleife entsprechend der gemessenen Topographie nachgeführt wird. Als Meßsignal wird dabei die z-Nachregelung des Piezoelements aufgezeichnet.

Im Constant-Height-Mode wird die Probe beim Rastern mit konstanter z-Stellung des Piezoelements nur in x- und y-Richtung bewegt. Das aufgezeichnete Meßsignal ist bei diesem Modus die Potentialdifferenz an der Zwei- bzw. Vierfeld-Photodiode.

Durch Darstellung des Meßsignals als Funktion der x-y-Position der Rasterbewegung wird ein dreidimensionales Bild der Probenoberfläche erzeugt.

2.3.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde benutzt, um ein Bild von den Materialien zu erhalten. Von Interesse war in diesem Zusammenhang die Oberflächenbeschaffenheit, wie zum Beispiel die Rauigkeit. Da diese Methode mittlerweile zu einer Standarduntersuchungsmethode geworden ist und zudem die Theorie und die Wirkungsweise gut verstanden sind, soll an dieser Stelle nicht darauf eingegangen, sondern auf weiterführende Literatur, z.B. Bergmann-Schäfer oder ander Lehrbücher der Physik, verwiesen werden.

2.4 Biokompatibilität

Auf die Bedeutung der Biokompatibilität wurde schon in der Einleitung eingegangen. Dabei wurden die Oberflächeneigenschaften herausgestellt.

Im kardiovaskulären Bereich finden die Wechselwirkungen von Gewebe und Stentimplantaten zwischen Blut und der Stentoberfläche sowie der Blutgefäßwand und der Stentoberfläche statt. Die beobachteten Mechanismen der Wechselwirkungen unterscheiden sich dabei grundlegend.^[RZANY00]

Über das Blut kommt es zu einer Anlagerung von Blutbestandteilen, die im folgenden genauer unterschieden werden. Durch den Kontakt mit Zellen kann ein Proliferationsreiz ausgelöst werden. Beide Prozesse führen zu dem Problem der In-Stent–Restenose, die das Implantat unwirksam werden läßt.

Bei der Beurteilung der Wechselwirkungen von Materialien mit Blut spricht man auch von Hämokompatibilität. Die erste Folge des Kontakts von Materialien mit Gewebe

und Blut ist eine Adsorption von Proteinen aus den Körperflüssigkeiten. In der kardiovaskulären Anwendung sind das Albumine und Fibrinogen.

2.4.1 Vorteile einer α :Si-C Metall Hybridstruktur

Im Falle von Stentimplantaten findet die Interaktion mit der Oberfläche/Proteinschicht hauptsächlich durch Endothelzellen, Thrombozyten und Granulozyten statt. Es konnte gezeigt werden, daß halbleitende Oberflächen mit ausreichend großer Bandlücke die Bildung von Fibrin unterdrücken. Das Protein Fibrinogen (Blutgerinnungsfaktor FI) wandelt sich in einem irreversiblen Prozeß in Fibrin um. Bei dieser Reaktion werden negative Ladungen freigesetzt. Die halbleitende Oberfläche kann diese Elektronen nicht aufnehmen, der Oxidationsschritt kann nicht stattfinden und somit unterbleibt die Quervernetzung der unterschiedlichen Fibrinogenmonomere zum Fibrin-Netzwerk.^[RZANY00]

2.4.2 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (Hyaluronan) ist ein einfaches Glykosaminoglykan (Polysaccharid) der extrazellulären Matrix. Es wird an der Oberfläche von Fibroblasten synthetisiert und ist somit natürlichen Ursprungs. Ferner läßt sich die Hyaluronsäure auch biotechnologisch gewinnen. Hyaluronsäure ist eine hochmolekulare Verbindung mit einem Molekulargewicht zwischen 50.000 und mehreren Millionen Dalton. In der folgenden Abbildung ist die Repetiereinheit, aus der sich die Hyaluronsäure zusammensetzt, dargestellt.

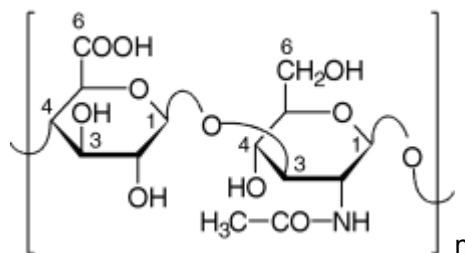


Abbildung 2-27: Repetiereinheit der Hyaluronsäure

Grundbaustein der Hyaluronsäure ist ein aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β -1-3-glykosidischer Bindung aufgebautes Aminodisaccharid, das mit der nächsten Einheit β -1-4-glykosidisch verbunden ist.^{[LAPCIK98],[LAURENT92]}

Hyaluronsäure kommt in Gelenken, dem Glaskörper des Auges und in der Haut vor. Zusammen mit den Chondroitinsulfaten und Dermatansulfaten wie dem Heparin ist Hyaluronsäure ein Bestandteil aller Bindegewebe.

2.4.2.1 Wirkungsweise der Hyaluronsäure

Hyaluronsäure wird in der Medizin erfolgreich zur Behandlung der Gelenksarthrose eingesetzt.^{[LAPCIK98],[MIYAZAKI98]} Dabei wirkt die HA auf unterschiedliche Art und Weise. Zum einen führt das viskose Gel allein durch seine mechanischen Eigenschaften zu einer Verbesserung, da der viskose Stoff kurzfristig die Knorpelfunktion ersetzen kann. Andererseits ist HA in der Lage, Radikale, insbesondere Hydroxylradikale, wie sie bei entzündlichen Reaktionen vorkommen, zu neutralisieren. Die Radikale können am Entzündungsherd somit nicht mehr reagieren.

Verschiedene in-vitro Untersuchungen zeigen bei der Applikation von Hyaluronsäure vielversprechende Ergebnisse in der Modulierung von glatten Muskelzellen bzw. von Endothelzellen.^{[CHUPA00],[SHERMAN94]} Weiterhin hat sich gezeigt, daß Hyaluronsäure eine eigenständige, entzündungshemmende Wirkung besitzt und damit wirkungsvoll Gewebsirritationen verhindert oder zumindest stark vermindert werden können.^{[AKATSUKA93],[SUZUKI93]} Weiterhin wird der Hyaluronsäure eine eigenständige, therapeutische Wirkung zugesprochen.

Wie Untersuchungen zeigen, hemmt besonders körpereigene Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von 340 kDa das proliferationsbedingte Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen.^[PAPAKONSTANTINO98]

2.4.2.2 Wirkstoffe, die die pharmakologische Wirkung der HA unterstützen

Die Wirkstoffe, die die gewünschten Eigenschaften besitzen, sollten die Restenose verhindern. Denkbar sind hier folgenden Substanzklassen:

- Entzündungshemmer, wie z.B. Cortisonderivate
- Radikalfänger
- Toxische Stoffe aus der Klasse der Zytostatika
- Transkriptionsfaktoren oder DNA-Fragmente
- Allosterische oder kompetitive Hemmer für unterschiedliche Rezeptoren

Vertreter der obengenannten Wirkstoffklassen werden bereits von einigen Firmen angeboten, bzw. befinden sich in der Erprobung. Der hohen Innovationskraft bei der Auswahl der Medikamente steht die mangelnde Verfügbarkeit geeigneter Wirkstoffcarrier gegenüber. Diese Diskrepanz ist einer der Gründe, die zum Entstehen dieser Arbeit führten.

2.4.3 Grundlagen der vaskulären Erkrankungen und der Stentbehandlung

Vaskuläre Erkrankungen, speziell koronare Herzkrankheiten, stellen mit die häufigste Todesursache in Industrieländern, zunehmend aber auch in den Ländern der sogenannten „dritten Welt“ dar. Die häufigste Erkrankungsform ist die Arteriosklerose.

Arteriosklerose wird nach neuen Erkenntnissen vor allem durch oxidativ-entzündliche Prozesse in der Gefäßwand hervorgerufen. In der nachfolgenden, immunologischen Reaktionskaskade bildet sich letztendlich eine fibröse Deckschicht aus Faserproteinen, die die darunter liegenden, lipidhaltigen Schaumzellen gegen die Blutbahn abschirmen. Der gesamte Erkrankungsprozeß kann aufgrund seiner Ätiologie als hyperproliferative Gefäßerkrankung bezeichnet werden.^[FORRESTER91] Zusammengefaßt werden die tiefgreifenden, strukturellen Veränderungen in der Gefäßwand als Plaque bezeichnet.

Die Entstehung von Plaque beginnt mit der Migration von Monozyten. Diese wandeln sich unter Einfluß von Cholesterin (ox-LDL und LDL) zu den genannten Schaumzellen um. Der Ablauf bis zur unkontrollierten Proliferation von glatten Muskelzellen ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

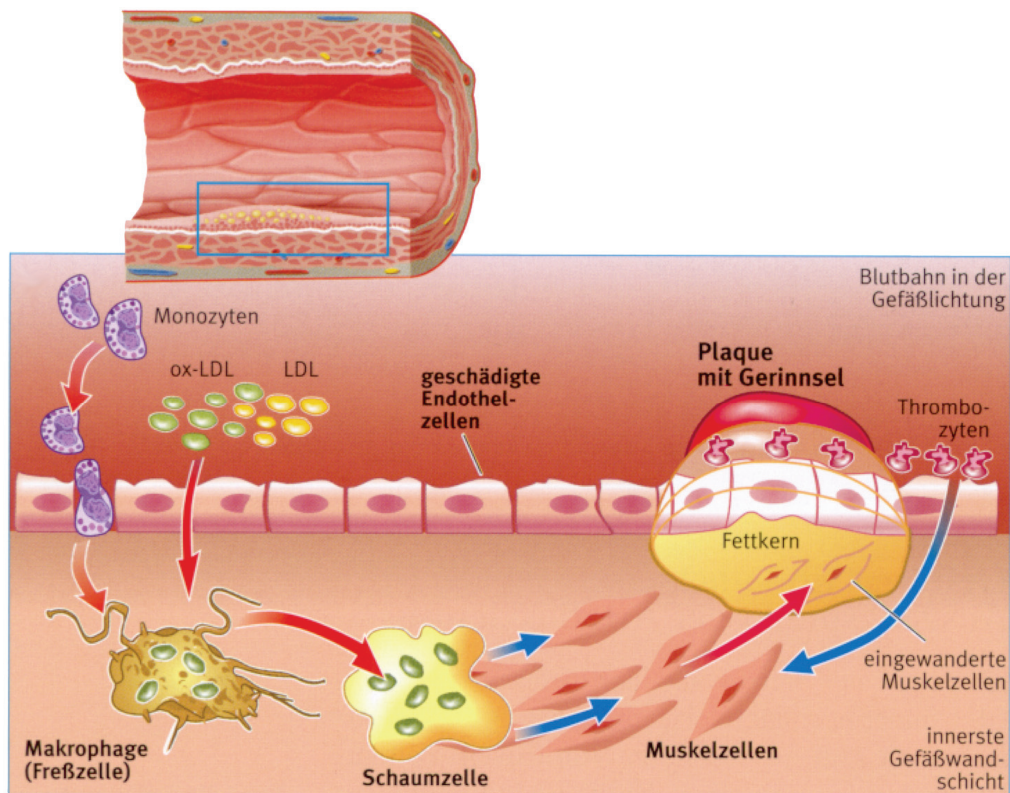


Abbildung 2-28: Entstehung einer Gefäßverengung

Die arteriosklerotische Plaque führt zunächst zu einer Verengung des Blutkanals (Stenose) und kann infolge weiterer, hier nicht näher erläuterter Prozesse Ausgangspunkt für sich schlagartig bildende Blutpfropfen infolge einer Gerinnung des Blutes sein (Herzinfarkt, Schlaganfall), wie in der folgenden Abbildung gezeigt.. Diese Kaskade von Vorgängen ist nicht auf eine arterielle Verletzung beschränkt, sie tritt auch infolge einer Verletzung von Venen und Arteriolen auf.

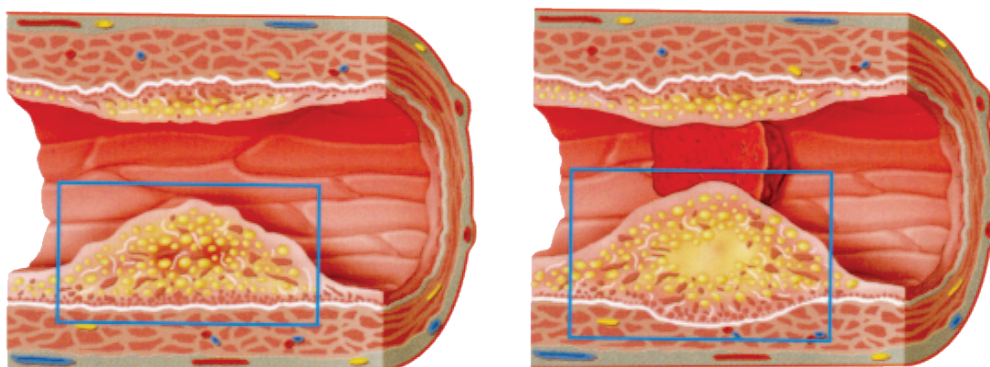


Abbildung 2-29: Plaque und festsitzender Blutpfropfen in einem Gefäß

Seit mehr als zwei Jahrzehnten haben sich nichtoperative Methoden zur Stenosebehandlung etabliert, bei denen unter anderem durch Ballondilatation (PTCA: Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie) das Blutgefäß wieder aufgeweitet wird. Mit dem Aufweiten des sklerosierten Blutgefäßes geht allerdings zwingendermaßen eine Verletzung der Gefäßwand einher, die zwar problemlos verheilt, jedoch unmittelbar nach dem Eingriff in einem großen Teil der Fälle zu einem thrombotischen oder mechanisch bedingten, frühen Verschuß des Gefäßes führt.

Diese Obstruktion kann durch Plazierung eines endovaskulären Implantats (Stent) vermieden werden.^{[FISCHMAN94],[SERRUYS94]} Stents werden seit nahezu 20 Jahren mit ständig wachsender Bedeutung zur Behandlung vaskulärer Erkrankungen eingesetzt. Durch den Einsatz von Stents kann zwar postoperativ ein optimaler Gefäßquerschnitt erreicht werden, allerdings führt ihr Einsatz auch zu Fremdkörperreaktionen, welche eine Wandproliferation induzieren und damit eine spätere Restenose auslösen können.^[SCHWARTZ92] Die Anwesenheit eines derartigen Fremdkörpers initiiert eine Kette von Prozessen, die zu einem allmählichen Zuwachsen des Stents führen können.^{[HOFMANN96],[STRAUSS91]}

Seit einigen Jahren versucht man, die Restenosegefahr bei der Implantation von Stents durch Aufbringung spezieller Beschichtungen zu mindern. Teilweise dienen die Beschichtungen als Träger, in die eine oder mehrere, pharmakologisch wirksame Substanzen eingebettet sind (Local Drug Delivery (LDD); drug eluting stents).

Der Träger derartiger Beschichtungssysteme besteht aus einem synthetischen oder natürlichen, biokompatiblen Material. Eine Freisetzung der pharmakologisch wirksamen Substanzen erfolgt im menschlichen bzw. tierischen Körper durch Degradation des Trägers bzw. durch Diffusion in das umgebende Gewebe. Als Wirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen für LDD-Systeme wurden bisher zahlreiche Präparate eingesetzt, welche in der Regel den konventionell eingesetzten Zytostatika und Immunsuppressiva entsprechen. Bekannt sind z.B. Stentbeschichtungen mit Heparin, Hirudin, Dexamethson, Paclitaxel, Tacrolimus und Rapamycin.^{[BABAPULLE02a],[BABAPULLE02b],[SOUSA03a],[SOUSA03b]}

Diese Wirkstoffe werden oft in synthetische Polymere eingebettet, welche als Wirkstoffreservoir dienen und das Medikament zeitlich kontrolliert freigeben. Jedoch verursachen viele dieser nicht abbaubaren, synthetischen Polymere im Tiermodell

außergewöhnliche Entzündungsreaktionen und eine neointimale Hyperplasie, welche das Risiko einer erneuten Restenose fördern.^{[DESCHERDER95],[VAN DER GIESSEN96]} Dagegen zeigen Schichtsysteme aus biokompatiblen Materialien natürlichen Ursprungs, wie beispielsweise Phosphorylcholin (neutrales Phospholipid tierischer Zellmembranen), eine gute Biokompatibilität, jedoch ohne eigenständige, antiproliferative Wirkung.^{[BABAPULLE02a],[LEWIS02]}

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Schichtsystem handelt es sich um die Beschichtung von Siliziumkarbidstents mit dem körpereigenen Glykosaminoglykan Hyaluronsäure (vgl. Abbildung 2-27). Dabei soll die bereits klinisch verifizierte, ausgezeichnete Biokompatibilität von mit amorphem Siliziumkarbid (SiC) beschichteten Stahlstents^{[HEUBLEIN98],[MONNINK99],[RZANY00]} um die anzunehmende, entzündungshemmende bzw. antiproliferative Wirkung der Hyaluronsäure erweitert werden.

Für die Beschichtung der Stents liegt die wasserlösliche und quellfähige Hyaluronsäure in vernetzter Form auf den Stents vor. Die Vernetzung des Polymers erfolgt mit Hilfe von Vernetzersubstanzen, welche auch zur Immobilisierung von Biomolekülen eingesetzt werden. Eine Vorbeschichtung der Stents mit einem Haftvermittler führt zu einer guten, mechanischen Belastbarkeit des Schichtsystems Stent-Hyaluronsäure.

Im Gegensatz zu anderen Stentbeschichtungen aus synthetischen bzw. anderen natürlichen Polymeren (Phosphorylcholin) ist eine antiproliferative Wirkung bereits allein durch eine Beschichtung der Stents mit Hyaluronsäure zu erwarten. Weiterhin eignet sich eine Stentbeschichtung aus Hyaluronsäure auf Grund ihrer biologischen und chemischen Eigenschaften als potentielle Matrix zur lokalen Freisetzung von Wirkstoffen im Bereich des Stents.^{[DROBNIK91],[LUO00],[VERCRUYSE98]}

Die Biokompatibilität und die therapeutische Wirkung von mit Hyaluronsäure beschichteten Stents, optional mit LDD Applikationen, muß nach umfassenden in-vitro Experimenten (Zellkultur) in Tierversuchen überprüft werden. Insbesondere sind die Hämkompatibilität und die Wechselwirkung der mit Hyaluronsäure bzw. Wirkstoff beschichteten Stents mit der Gefäßwand histologisch zu untersuchen. Für diese Fragestellung der In-Stent-Restenose eignet sich das Schwein als Tiermodell am besten und ist deswegen zulassungsbehördlich vorgeschrieben.

Koronare Schweinearterien besitzen eine Struktur und Physiologie, welche der von

menschlichen Koronararterien sehr ähnlich ist. Die neointimale Hyperplasie im Schwein wird durch Überdehnung des Gefäßdurchmessers erzielt, welche durch Überdilatation eines Ballonkatheters oder Koronarstents erreicht wird. Der Grad an neointimaler Hyperplasie in diesem Tiermodell korreliert dabei mit der Schwere der Verletzung der Gefäßwand. Eine mögliche Cytotoxizität der Schichtsysteme Stent-Hyaluronsäure ließ sich in bereits durchgeführten Zellkulturuntersuchungen nicht nachweisen.^{[HEUBLEIN98],[VERHEY00]}

2.4.4 Zellkulturtests in-vitro

Im Modellversuch wurde die Eignung der Materialien bei der Wechselwirkung mit lebenden Zellen untersucht. Dabei wurden humane Endothelzellen (endothelial cells, EC) und humane glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC) untersucht. Die EC übernehmen das Einheilen des Implantats in das Gewebe. Die glatten Muskelzellen sind maßgeblich für die postoperativen Probleme verantwortlich, die bei vielen Patienten eine Nachbehandlung erforderlich machen. Wünschenswert wäre also ein ungehindertes Wachstum der EC, um den Stent einheilen zu lassen, und eine Inhibierung der SMC.

3 Experimenteller Teil

3.1 Chemische Verfahren zur Vernetzung von Polymeren

Im folgenden werden zunächst die chemischen Reaktionen gezeigt, die zu den vernetzten Strukturen führen.

3.1.1 Derivatisierung der Hyaluronsäure

Der Hyaluronsäure wird ein großes Potential in ihrer Bioverträglichkeit zugeschrieben. Aus diesem Grund wurden damit die meisten Versuche unternommen, um ein wasserunlösliches Derivat zu erhalten.

3.1.1.1 Herstellung des Boratpuffers

3 g (0,00787 mol) Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$) werden in 100 ml destilliertem Wasser (3 % w/w) gelöst, und der pH-Wert wird mit 1 n Salzsäure auf pH 8,5 eingestellt.

3.1.1.2 Derivatisierung der Hyaluronsäure mit Methacrylsäureanhydrid

2 g (4,9590 mmol) Hyaluronsäure werden in 100 ml Boratpuffer (pH 8,5) gelöst. Die 2 %ige Lösung wird auf 5 °C temperiert und mit 30 mg (Spatelspitze) Hydrochinon (Radikalfänger (Inhibitor), zur Verhinderung vorzeitigen Vernetzens) versetzt. Unter Rühren erfolgt über einen Zeitraum von 30 Min. die tropfenweise Zugabe von 16,8 ml (17,506 g; 0,1136 mol) Methacrylsäureanhydrid, was einem 20-fachen molaren Überschuß entspricht. Der pH-Wert wird während der Zugabe des Methacrylsäureanhydrids mit 5 M Natronlauge im Bereich von pH 8 bis 9 gehalten.

Das Reaktionsgemisch wird zur vollständigen Umsetzung 24 Std. bei 5 °C und einem pH-Wert von 8 bis 9 gerührt.

Nach dem Ende der Reaktionszeit wird das Produkt in Aceton gefällt, abfiltriert und mit Aceton gewaschen, um die entstandene Methacrylsäure und Reste des Eduktes zu entfernen. Das Präzipitat wird im Anschluß durch Trocknung im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit.

3.1.1.3 Derivatisierung der Hyaluronsäure mit Itakonsäureanhydrid

2 g (4,9590 mmol) der Hyaluronsäure werden in 100 ml Boratpuffer (pH 8,5) gelöst und mit 30 mg (Spatelspitze) Hydrochinon versetzt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur unter Rühren mit 10 g (0,0892 mol) Itakonsäureanhydrid versetzt. Die Zugabe des Feststoffs geschieht über einen Zeitraum von 30 Min. mit Hilfe einer Feststoffdosiereinheit (Fa. Hirschman; Feststoffschnecke). Dabei wird der pH-Wert mit 5 M NaOH-Lösung im Bereich von pH 8 - 9 gehalten. Im Anschluß an die Zugabe der Itakonsäure wird die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 8 - 9 für 24 Std. gerührt. Nach dem Ende der Reaktionszeit wird das Produkt in Aceton gefällt, abfiltriert und mit Aceton gewaschen, um die entstandene Itakonsäure und Reste des Eduktes zu entfernen. Das Präzipitat wird im Anschluß durch Trocknung im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit.

3.1.1.4 Derivatisierung der Hyaluronsäure mit Mercaptofunktionen

3.1.1.4.1 Derivatisierung mit Mercaptopropionsäure

7,2 ml (7,8 g; 0,083 mol) Mercaptopropionsäure werden mit einer äquimolaren Menge (15,911 g) EDC zur Reaktion gebracht. Der Reaktionsverlauf wird über DC-Karten verfolgt. Dazu werden Silicagel-Karten (Fa. MN) benutzt, mit Acetessigsäureethylester als Laufmittel ($R_F=7,8$). Der Reaktionsansatz wird dann bei RT unter Rühren zu einer 1 %igen HA-Lösung gegeben. Die Reaktion ist nach vier Std. abgeschlossen. Nach zwölf Std. wird die Reaktion abgebrochen. Die Reaktion

wird unter Stickstoff gegen Wasser dialysiert. Zur Herstellung von Folien wird die Lösung in Schalen ausgegossen und der Raumluft ausgesetzt. Nach zehn Tagen erhält man eine durchsichtige, wasserunlösliche Folie.

3.1.1.4.2 Oxidation der -SH-Bindungen zur Herstellung der Disulfidbrücken

Alternativ zur Reaktion an der Raumluft wurde die Zugabe eines Oxidationsmittels untersucht. Dazu wurden nach dem Gießen der Folien diese mit 3 ml einer 3 %igen H_2O_2 -Lösung überschichtet.

3.1.1.4.3 Umsetzung der Hyaluronsäure zu einem Cystein-Derivat

2 g (4,9590 mmol) HA werden in einem Doppelmantelreaktor in 200 ml Wasser gelöst, es erfolgt die Zugabe von 0,125 mol Cystein. Bei einer Temperatur von 15 °C werden 5,73 mmol Bromcyan, entsprechend 0,61 g, zugegeben.

Alternativ:

Bei polymeranalogen Umsetzungen empfiehlt sich ein 10-facher molarer Überschuß. Entsprechend wird bei sonst gleichem Ansatz 6,1 g Bromcyan zugegeben. Eine weniger aufwendige, aber sehr viel teurere Alternative besteht in der Verwendung von CDAP, statt des sehr giftigen und schwer zu handhabenden Bromcyans.

3.1.1.5 Derivatisierung der Hyaluronsäure mit einem Aminosäuremethylester

400 mg (0,992 mmol) Hyaluronsäure-Na-Salz, Natriumhyalonat, werden in 40 ml Wasser gelöst, und die Lösung wird auf 22 °C temperiert. Bei einem pH-Wert von 4,75 werden 314 mg (1,638 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) und 190 mg (1,2 mmol) L-Leucin-methylester-hydrochlorid zu der Lösung gegeben. Der pH-Wert wird dabei mittels 0,1 n Salzsäure stabilisiert. Diese Lösung wird mit dem gleichen Volumen einer 3 %igen Na-Alginatlösung gemischt.

3.1.1.6 Photovernetzung der Hyaluronsäurederivate

3.1.1.6.1 Herstellung des Photoinitiators

Der Photovernetzer besteht aus zwei Lösungen, die getrennt hergestellt werden:

Vernetzerlösung 1 besteht aus 5 M Triethanolamin in Wasser,

Vernetzerlösung 2 besteht aus 0,3 % EosinY, gelöst in Vinylpyrrolidon.

3.1.1.6.2 Photovernetzung der methacrylierten Hyaluronsäure

Für die Vernetzung wird eine 2 %ige Lösung der methacrylierten Hyaluronsäure in destilliertem Wasser hergestellt. Pro ml dieser Lösung werden 50 µl Vernetzerlösung 1 und 5 µl Vernetzerlösung 2 zugegeben. Die Initialisierung der Photoreaktion erfolgt mittels einer 11 W Leuchtstoffröhre. Nach einer Bestrahlungsdauer von 15 - 20 Min. ist der Photoinitiator entfärbt, und das Netzwerk hat sich gebildet.

3.1.1.6.3 Photovernetzung der itakonisierten Hyaluronsäure

Für die Vernetzung der itakonisierten Hyaluronsäure wird eine 8 %ige wässrige Lösung verwendet. Pro ml dieser Lösung werden 50 µl Vernetzerlösung 1 und 5 µl Vernetzerlösung 2 zugegeben. Die Initialisierung der Photoreaktion erfolgt durch Bestrahlung mit einer 11 W Leuchtstoffröhre über 15-20 Min.

3.1.1.7 Vernetzung der mit Mercaptogruppen derivatisierten Hyaluronsäure

Die Reaktion wird durch Oxidation an der Luft durchgeführt. Dazu werden Folien gegossen und für 48 Std. mit Petrischalen abgedeckt (Staubschutz) der Umgebungsluft ausgesetzt.

Die Vernetzung mit H_2O_2 geschieht, indem die gegossenen Folien mit einer 3 %igen H_2O_2 -Lösung überschichtet werden.

3.1.2 Vernetzung von Hyaluronsäure mit niedermolekularen Vernetzern

3.1.2.1 Vernetzung von Hyaluronsäure mit Glutaraldehyd

Die Vernetzerlösung besteht aus:

240 ml Aceton (über Molsieb 3 Å getrocknet),
80 ml 25 %ige Glutaraldehydlösung in Wasser und
1,6 ml 3 M HCl.

Als Fixiererlösung wird eine 2,25 %ige (1g/45ml H_2O) Lösung des Natriumcyanoborhydrids hergestellt.

Eine 1 - 2 %ige HA-Lösung wird auf dem Boden einer Petrischale verteilt. Dabei werden für eine Schale mit einem Durchmesser von 6 cm ca. 1,5 ml benötigt. Die Lösung wird bei RT über Phosphorpentaoxid bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Es bildet sich auf dem Boden der Petrischale ein durchsichtiger Film.

Dieser Film wird bei RT mit 4 ml der Glutaraldehydvernetzerlösung überschichtet. Zur Vermeidung von Verdunstungseffekten wird die Petrischale mit dem Deckel verschlossen.

Nach vier Std. wird die Vernetzerlösung mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und einer „blauen Spitze“ abgezogen und gegen frische Vernetzerlösung getauscht. Wieder wird bei RT für zwölf Std. inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der

Überstand wie zuvor abgezogen. Die entstandene Folie wird 4 - 5 mal mit je fünf ml Wasser (bidest.) gewaschen.

Im Anschluß erfolgt der Fixierungsschritt mit 4,5 ml Fixiererlösung pro Petrischale.

Nach Inkubation über eine Std. bei RT wird die Fixiererlösung abgezogen, und es folgen mehrere Waschschrte:

3 x mit je 5 ml Wasser (bidest.),

3 x mit je 5 ml einer isotonischen Kochsalzlösung (0,9 %).

Hierbei werden die Waschlösungen zugegeben und vor dem Absaugen der Lösung 30 Sek. geschwenkt.

3.1.2.2 Vernetzung von Hyaluronsäure mit Epichlorhydrin

2 g (4,9590 mmol) HA werden in 100 ml Wasser gelöst. Es erfolgt eine Zugabe von 20 g (0,5 mol) NaOH und von 14 ml einer 25 %igen NH_3 -Lösung. Bei 6 °C werden 40 ml (0,49 mol) Epichlorhydrin zugesetzt, dabei wird das Volumen über ca. 30 - 40 Min. verteilt zugegeben. Man erhält eine Zweiphasenmischung, die sich nach zwei Std. auflöst. Die Lösung wird über mindestens vier Std. auf 18°C erhöht. Nach weiteren 10 Std. wird die Reaktion abgebrochen. Der Ansatz wird gegen Wasser dialysiert, bis das Dialysewasser einen pH-Wert im neutralen Bereich zeigt. Nach erfolgter Dialyse liegt der vernetzte Zustand nach dem Trocknen vor. Die dialysierte Lösung ist über drei Monate bei 4 °C stabil. Der vernetzte (wasserunlösliche) Zustand wird durch Trocknen bei RT erreicht.

Herstellung von beschichteten Stents und Folien:

Bei der Beschichtung von Stents muß das Dialysat eingeengt werden, die Stents werden dann durch Eintauchen in das eingeengte Dialysat beschichtet. Aus dem Dialysat werden die Folien gegossen, nach dem Trocknen liegt das wasserunlösliche, polymere Netzwerk vor.

3.1.2.3 Vernetzung von Hyaluronsäure mit Divinylsulfon

0,5 g (1,24 mmol) HA werden in 50 ml einer 0,1 molaren NaOH-Lösung zu einer 1 %igen Lösung gelöst. Die Reaktion wird auf Eis gekühlt. Bei 0 °C erfolgt die Zugabe von 6 ml (7,062 g; 0,0598 mol) Divinylsulfon. Der Ansatz wird für 15 Min. auf Eis gerührt. Bei der Erwärmung auf RT beträgt die Topfzeit ca. 5 Min., in dieser Zeit können Folien gegossen werden oder entsprechend Stents über einen Tauchschrift beschichtet werden.

3.1.2.4 Vernetzung von Hyaluronsäure durch Diglycidylether

50 ml einer 2 %igen HA-Lösung werden in einem temperierbaren Doppelmantelreaktor mit KPG-Rührer gerührt, bei 65 °C werden 10 ml (0,075 mol) Triethylamin zugegeben. Nach 15 Min. erfolgt die Zugabe von 10 ml (11,51 g; 0,060 mol) Diglycidylether aus einer gekühlten Vorlage. Die Zugabe erfolgt tropfenweise und sollte über einen Zeitraum von 15 Min. verteilt werden. Dabei muß die Reaktionslösung intensiv gerührt werden (150 U/Min.). Nach drei Std. Reaktionsdauer wird die Reaktion auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Vervollständigung wird die Reaktion über Nacht gerührt.

Das Produkt wird gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

3.1.3 Vernetzung mit Hilfe von Nullängenvernetzern (zero lenght crosslinker)

3.1.3.1 Autovernetzung der HA durch die Bromcyanmethode

1 g (2,479 mmol) HA werden in 50 ml Wasser gelöst, 8,1 ml (0,0625 mol) Triethylamin werden zugegeben. Nach Erreichen einer Innentemperatur im Doppelmantelreaktor von 15 °C werden 4,2 g (0,0396 mol) Bromcyan zugegeben.

Nach dem Dialysieren gegen Wasser können mit dieser Lösung Folien gegossen werden, die nach dem Trocknen wasserunlöslich sind.

3.1.3.2 Vernetzung von Hyaluronsäure mit EDC

Beim 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC) handelt es sich um ein wasserlösliches Carbodiimid (vgl. DDC).

3 ml einer 2 %igen Hyaluronsäurelösung werden in Petrischalen ausgegossen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zu jeder Schale werden 5 ml einer 0,5 %igen EDC-Lösung gegeben. Die Reaktion findet bei RT für 60 Min. statt. Zur Vervollständigung der Reaktion wird die Schale bei 50 °C über 2 Std. erhitzt. Beim Abkühlen wird erneut EDC-Lösung zugegeben, nach 30 Min. bei RT wird das Material aufgearbeitet. Die Aufarbeitung geschieht über mehrere Waschschr

3x mit je 5 ml Wasser (bidest.)

3x mit je 5 ml einer isotonischen Kochsalzlösung (0,9 %)

3.1.3.3 Vernetzung mit Hilfe der Diimidazol Methode

Hyaluronsäure wird nach dem oben angegebenen Verfahren mit EDC aktiviert. Nach Ablauf der Reaktion wird eine äquimolare Menge Diimidazol (bezogen auf die Carbonylfunktion) zugegeben. Die Reaktion verläuft bei RT für 30 Min.

3.1.4 Vernetzung von Polyethylenglycol (PEG) mit Hexamethyldiisocyanat (HMDI)

Polyethylenglycol (MW 4000 g/mol) wird fein gemörst und fünf Tage bei vermindertem Druck (Wasserstrahlvakuum, 17 Torr) im Exikator über Phosphorpentaoxid getrocknet.

In 2-ml-Eppendorf-Reagiergefäßen werden je 1 g PEG eingewogen und bei 62 °C geschmolzen. Zu der Schmelze werden 100 - 200 µl HMDI zugegeben. Die zweiphasige Mischung wird unter Verwendung eines Vortex gut durchmischt und für 1,5 Std. bei 62 °C inkubiert. Im Abstand von 30 Min. wird die Mischung mit einer Pasteurpipette gerührt. Nach der Topfzeit wird das Material aus der Schmelze heraus verarbeitet.

3.2 Verfahrenstechnischer Teil

3.2.1 Herstellungsverfahren der benötigten Polymerformen

3.2.1.1 Formgebung von Alginat und Chitosan durch ionothrope Gelbildung

Die ionothrope Gelbildung findet in allen Fällen bei Raumtemperatur statt. Die Reaktionen verlaufen spontan, die Gestaltgebung des Material erweist sich als sehr leicht. Eine gute Übersicht zur Herstellung von Kugel und Kapseln ist in der Literatur gegeben.^[SPIEKERMANN90]

3.2.1.1.1 Reinigung von Algiant und Chitosan

Die käuflichen Produkte Alginat und Chitosan werden vor der Verwendung zur ionothropen Gelbildung einem Extraktionsschritt zur Reinigung unterworfen. Dazu werden je 10 g Alginat, beziehungsweise Chitosan, bis zur Entfärbung (48 Std.) mit 250 ml Aceton in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Im Anschluß wird der extrahierte Feststoff zur Befreiung von Lösungsmittelresten 16 Std. im Hochvakuum getrocknet.

3.2.1.1.2 Formgebung von Ca-Alginat

Kugeln

Eine 2 %ige Natrium-Alginatlösung wird durch Preßluft über eine Kanüle von 1 mm Durchmesser in eine 0,5 M CaCl_2 getropft, die Tropfhöhe beträgt 20 cm. Die Perlengröße läßt sich über einen Gasstrom einstellen, der parallel zur Kanüle geführt wird und ein vorzeitiges Abreißen des Tropfens bewirkt. Nach 15-30 Min. Aushärtezeit können die Perlen abgesiebt und gewaschen werden.

Kapseln

Eine 400 mM CaCl_2 -Lösung wird in eine 0,7 - 1 %ige Na-Alginatlösung getropft und nach 2 Min. abgesiebt und gewaschen. Man erhält Gelhohlkugeln, deren Durchmesser über einen parallel zur Kanüle geführten Gasstrom eingestellt werden können. Die Wandstärke beträgt 0,3 - 0,5 mm. Die Wanddicke kann dabei durch die Reaktionszeit beeinflusst werden.

Schläuche

Ein zylindrischer, metallischer Träger von 1,2 mm Durchmesser wird mit einer 0,7 - 1 %igen Na-Alginatlösung benetzt und in eine 400 mM CaCl_2 -Lösung getaucht. Nach erfolgter Härtung kann der Schlauch vom polierten Metall abgelöst werden.

3.2.1.1.3 Formgebung von Chitosan

Kugeln

Eine 2 %ige Chitosanlösung in 1 %iger Essigsäure wird nach der unter 3.2.1.1.2 beschriebenen Methode in eine 1 %ige Penta-Natriumpolyphosphatlösung (pH 5) getropft. Nach 45 Min. können die Perlen abgesiebt und gewaschen werden.

Schläuche

Ein metallischer Träger, wie unter 3.2.1.1.2 beschrieben, wird mit einer 3 %igen Chitosanlösung in 10 %iger Essigsäure beschichtet und in die 1 %ige Penta-Natriumpolyphosphatlösung getaucht. Nach 25 Min. kann der Schlauch vom Träger entfernt werden.

3.2.1.1.4 Formgebung von Alginat/Chitosan Symplex-Gelen

4 ml einer Ca-Alginat Suspension (10 %) in CaCl_2 (1 %) werden zu 26 ml Chitosanlösung (Low-viscosity; 25 %; Fa. Fluka) gegeben und suspendiert. Für die Herstellung der Na-Tripolyphosphat-Lösung werden 15 g Tripolyphosphat (Natriumpentaphosphat; Fa. Fluka) in 1 l Wasser bidest. gelöst. Mit 1n HCl wird der pH-Wert auf 6 eingestellt.

Der pH-Wert der Alginat/Chitosan-Suspension wird mit 1 n HCl auf 5,5 eingestellt. Nach Säurezugabe wird die Lösung stark viskos. Diese Lösung wird in 1,5 %ige Penta-Natriumpolyphosphatlösung pH 6 getropft, bzw. ein mit Suspension beschichteter Träger wird eingetaucht. Nach 50 Min. können die Kapseln bzw. der Schlauch entfernt und gewaschen werden.

3.2.1.2 Formgebung von mit HMDI vernetztem PEG

3.2.1.2.1 Zylinder

2 g Polyethylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 4000 g/mol werden bei 63° C geschmolzen und mit 120 µl HMDI versetzt. Nach 60 Min. Reaktionszeit wird die Schmelze in Formen gegossen. Hierfür werden handelsübliche 96-Wellplatten für Zellkulturuntersuchungen benutzt. Nach 12 Std. Wartezeit bei Raumtemperatur können die Zylinder mit Hilfe von Wasser aus der Form entnommen werden. Bei Kontakt mit Wasser quillt das Material auf, eine Haftung auf der Formoberfläche tritt jedoch nicht auf, so daß bei glatter Form ohne Trennmittel gearbeitet werden kann.

3.2.1.2.2 Schläuche

Allgemeines Herstellungsverfahren der Schläuche

Die Schläuche aus mit HMDI vernetztem PEG werden im Tauchverfahren hergestellt. Dazu werden Pasteurpipetten benutzt, die im vorderen Bereich einen Außendurchmesser von 1,2 mm besitzen. Die Pasteurpipetten werden nach Ablauf der Topfzeit in die Schmelze getaucht und anschließend umgedreht aufgestellt. Die Polymermasse wird am Träger für 12 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Diese sog. „Sinterzeit“ ist nötig, um Schläuche zu erhalten. Nach Ablauf dieser Zeit kann das vernetzte Polymer mit Hilfe von Wasser vom Träger gelöst werden. Es werden Schläuche von 5 cm Länge und einem Innendurchmesser von 1,2 mm erhalten.

Die so erhaltenen Schläuche weisen jedoch keine kontrollierbare Wandstärke auf. Daher wurde das Verfahren weiterentwickelt, um die Wandstärke der Schläuche einstellen zu können.

Herstellung von Schläuchen mit definierter Wandstärke

Eine PVC-Platte von 1 cm Dicke wurde mit 36 Bohrungen von 1,2 mm Durchmesser versehen. Diese Bohrungen waren ca. 9 mm tief. Die Löcher wurden dann bis zu einer Tiefe von 6 mm auf einen Durchmesser von 2,3 mm aufgebohrt. In diese Löcher können Schmelzpunktbestimmungsröhrchen von 1,2 mm Dicke und Glasrohre von 2,3 mm Außendurchmesser gesteckt werden, so daß ein Hülse-Kern-Modell entsteht. Die Schlauchherstellung wird so durchgeführt, daß das Glasrohr senkrecht in die große Öffnung gesteckt wird und mit der Schmelze aus PEG/HMDI gefüllt wird. In die noch heiße Schmelze wird der Kern (Schmelzpunktbestimmungsröhrchen) gesteckt. Nach dem Aushärten und dem Sintern des Materials kann die Glasummantelung zerschlagen werden, um den Schlauch zu erhalten. In den meisten Fällen genügt aber auch das Einlegen in Wasser, um den Schlauch sowohl vom Kern als auch von der Hülse zu lösen.

3.2.1.2.3 Folien

Die nach 3.2.1.2.1 erhaltene Schmelze wird in auf 40 °C temperierte Petrischalen von 6 cm Durchmesser gegossen. Die Schmelze erstarrt nicht sofort, sondern verläuft auf einer ebenen Oberfläche zu einem gleichmäßigen Film.

3.2.2 Herstellung von Haftvermittlersystemen

Die folgenden Untersuchungen wurden an oberflächenvergüteten Silizium-Wafern als Modellsystem durchgeführt.

Alle Substrate werden als Vorbehandlung 15 Min. bei 25 °C im Isopropanolbad mit Ultraschall gereinigt.

3.2.2.1 Reinigung und Aktivierung der Oberflächen

3.2.2.1.1 Chemisches Ätzen der Oberfläche

Für das chemische Ätzen bzw. die Aktivierung wird der Wafer in 10 %ige Flußsäure für 5 Min. bei RT eingelegt und im Anschluß mit dest. Wasser gespült.

3.2.2.1.2 Ätzen durch Plasmabehandlung

Die Wafer werden nach der Vorbehandlung in den Rezipienten der Plasmaanlage eingeschleust. Der Rezipient wird nach Erreichen des Enddruckes (0,1 mbar) für weitere 10 Min. evakuiert. Nach Zugabe des Synthesegases wird das Plasma gezündet. Folgende Prozeßparameter werden dabei variiert.

Tabelle 3-1: Prozeßparameter der Plasmabehandlung

<i>Synthesegas</i>	<i>Prozeßdauer [Min]</i>	<i>Leistung [W]</i>	<i>Additive</i>
Argon	30	200	
Argon	30	200	Teflon (PTFE)
Sauerstoff/Wasser	15	200	Teflon (PTFE)
Sauerstoff	15	200	Teflon (PTFE)

Nach dem Abschluß der Plasmabehandlung wird der Rezipient mit Umgebungsluft belüftet, und die Proben werden entnommen.

3.2.2.2 Haftvermittler auf Silanbasis

Für die Silanisierung werden 100 µl Trimethoxypropylaminosilan in 15 ml trockenem Toluol gelöst. Die Wafer werden in trockene Reagenzgläser überführt und mit 2 ml der Silanlösung überschichtet. Nach 15 Min. werden die Wafer mit Dichlormethan gespült und bei 75 °C für 1 Std. inkubiert.

3.2.2.3 Plasmatechnisch hergestellte Haftvermittler

Analog zu der Plasmaätzung werden die Wafer in den Rezipienten eingeschleust und der Rezipient evakuiert. Das Plasma wird bei einem Druck von 0,17 mbar gezündet. Der Precursor wird über eine Verdampfungseinheit mittels eines Nadelventils und Rotameters in den Plasmaraum geleitet. Der Prozeßdruck wird auf maximal 0,3 mbar eingestellt. Die folgenden Parameter werden variiert.

- Plasmaleistung
- Prozeßdauer
- Precursor
- Druck

- Synthesegas
- Geometrie der Plasmakammer (Elektrodenabstand)

Bei einigen Oberflächen wird eine Nachbehandlung durch ein Sauerstoffplasma durchgeführt. Dabei wird eine geringe Leistung (<50 W) und eine kurze Dauer (<1 Min.) gewählt.

3.3 Analytischer Teil

3.3.1 Messung des Quellungsfaktors

Die Polymerproben werden bis zur Gewichtskonstanz über Sicapent® (P₂O₅) getrocknet und gewogen. Zu den Polymerproben kommt das Lösungsmittel, in dem das Quellverhalten untersucht werden soll. Aufgrund der Anwendungsziele der Polymere wurden Wasser und 0,9 %ige Kochsalzlösung untersucht. Das Wasser bzw. die Salzlösung muß im großen Überschuß vorliegen (100fache Gewichtsmenge, bezogen auf das Polymertrockengewicht). Die Quellungsdauer beträgt bei PEG 30 Min., bei den Sacchariden reicht eine Quellungsdauer von 15 Min. aus. Nach dieser Zeit hat sich das Gleichgewicht eingestellt. Überschüssiges Wasser bzw. Lösungsmittel wird mit einer Eppendorfpipette vorsichtig abgenommen. Die nun gequollene Polymerprobe wird erneut gewogen. Der Quellungsfaktor wird nach der Formel

$$q = \frac{W_q}{W_t}$$

Formel 3-1

ermittelt (vgl. 2.2.1).

3.3.2 Ermittlung des Wassergehalts

Der Wassergehalt der Proben wird analog zu den Quellungsfaktoren bestimmt.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel (vgl. 2.2.2)

$$W_g = \frac{w_q - w_t}{w_q} \cdot 100$$

Formel 3-2

3.3.3 Ermittlung des E-Moduls

Die Kraftdehnungsdiagramme werden mit Hilfe einer an einer Hebebühne befindlichen Kraftmeßdose und einem x/t-Schreiber angefertigt. Der Probenkörper (Schlauch, Folie) wird mit zwei Klemmvorrichtungen befestigt, wobei eine Klemme an der Kraftmeßdose angebracht ist. Die Kraftmeßdose gibt die anliegende Kraft in Form eines elektrischen Stroms an den x/t-Schreiber (Auslenkung der Kurve), während der Papiervorschub des Schreibers proportional der Längenänderung ist.

Zur Bestimmung von Kraft (F) und Längenänderung (ΔL) wird die Anlage kalibriert. Dazu werden nacheinander drei Gewichte (1 g, 10 g, 11 g) an der Kraftmeßdose angebracht und der Schreiberausschlag ermittelt. Aus $F = m \cdot g$ erhält man die wirkende Kraft, wobei $g = 9,8 \text{ m/s}^2$ die Erdbeschleunigung ist. Ebenso wird die Papiervorschubgeschwindigkeit mit einer Längenänderung ins Verhältnis gesetzt. Die Längenänderung (Entfernung der Klemmen voneinander) wird mit einer Schieblehre ermittelt.

Der Ausgangsquerschnitt der Schläuche wird mit

$$A = \frac{1}{4} \pi (d_1^2 - d_2^2)$$

Formel 3-3

berechnet, wobei $d_1=0,5$ cm und $d_2=0,3$ cm beträgt. Aus den so ermittelten Werten (A , F , ΔL und L_0) kann mit der schon im theoretischen Teil gezeigten Formel das E-Modul berechnet werden.

$$E = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta L}{L_0}}$$

Formel 3-4

3.3.4 Thermische Analyse mit Hilfe der Differential Scanning Calometrie (DSC)

3.3.4.1 DSC-Messungen der Glasübergangstemperatur und des Schmelzpunktes

Für die Messungen werden Probenbehälter aus Aluminium verwendet, die als Einmal-Tiegel konzipiert sind. Als Referenz dient ein leerer Tiegel. Der Tiegeldeckel wird vor dem Verschließen mit der Tiegelpresse mit einer Nadel durchstoßen, um so einen Gasaustausch mit der Meßzellenatmosphäre zu ermöglichen. Einerseits können so Dämpfe, die die Proben bei erhöhter Temperatur abgeben (Feuchtigkeit, Lösungsmittelreste, Weichmacher, Monomere, etc.), entweichen, und zum anderen kann die beim Verschließen eingeschlossene Luft durch das Spülgas - vorzugsweise Stickstoff - ausgetauscht werden. Stickstoff sollte mit einer Durchflußrate von 50 ml/Min. als Spülgas eingesetzt werden. Ruhende Luft ist nur zulässig, wenn die Endtemperatur der Messung unterhalb der Zersetzungstemperatur von instabilen Komponenten bleibt. Stickstoff als Spülgas ist auch unter dem Aspekt zu empfehlen,

daß die Proben zweimal gemessen werden sollten. Die Unterschiede zwischen der ersten und der zweiten Aufheizkurve lassen die thermische Vorgeschichte (Lager- und Tempereffekte, Spannungen, Verdampfen flüchtiger Bestandteile, etc.) erkennen. Weiterhin besitzt die Probe nach dem ersten Aufheizen einen verbesserten Wärmekontakt zum Tiegel. Aus diesem Grund werden in den Auswertungen die Glastemperaturen (und die anderen zu bestimmenden Größen) aus der zweiten Aufheizkurve ermittelt.

3.3.4.2 Bestimmung der Glasübergangstemperatur (T_g)

Wie oben erwähnt ist der T_g -Wert abhängig von der Heizrate. Die verwendete Heizrate muß mit angegeben werden. Für die Bestimmung von Glastemperaturen wird eine Aufheizgeschwindigkeit von 20 K/Min. gewählt, wobei die Starttemperatur mindestens 50 K unter dem zu erwartenden T_g liegen sollte. Ist dies nicht möglich, muß die Heizrate auf 10 K/Min. reduziert werden. Dann genügt eine Starttemperatur von 30 K unterhalb T_g . Analog wird auch die Endtemperatur oberhalb T_g gewählt. Die Probeneinwaage sollte etwa 20 mg betragen. Die verwendeten Polymere fielen dabei oft in einer Form (Schlauch, Folie) an, die nur Einwaagen von 10 mg ermöglichten. Die Messungen sind hier entsprechend weniger aussagekräftig.

Zum Füllen des Tiegels wird dieser auf den Probenhalter gesetzt. Der spezielle Trichter wird auf den Tiegel aufgesetzt, mit dem Metallstempel wird das Polymer in den Tiegel gepresst. Die Auswertung erfolgt durch Anlegen von Tangenten an die Wärmefluß-Temperatur-Kurve. Als Temperatur der Glasumwandlung wird üblicherweise die Temperatur bei halber Stufenhöhe angegeben. Der verbesserte Wärmeübergang nach dem ersten Aufheizen führt in der zweiten Aufheizkurve zu einer etwa 1 °C niedrigeren Glasübergangstemperatur T_g .

3.3.4.3 Untersuchungen von Schmelzvorgängen

Bei den Untersuchungen von Schmelzvorgängen hat sich eine Aufheizrate von 10 K/Min. bewährt. Die Wahl der Starttemperatur richtet sich nach dem Schmelzbereich bzw. der Temperaturlage sonstiger zu messender Effekte. Wegen

der oft breiten Schmelzbereiche sollte die Starttemperatur mindestens 100 K unterhalb der Peakspitzen-Temperatur liegen. Die Ermittlung der Kristallinität beruht auf der Proportionalität der gemessenen Schmelzenthalpie und der Menge der vorhandenen Kristallite. Die spezifische Schmelzenthalpie der vernetzten, biokompatiblen Materialien, wie dem Polyethylenglykol, ist nicht bekannt. Die Kristallinität ist im wesentlichen vom gleichmäßigen Aufbau der Makromoleküle (kurze Seitenketten in gleichmäßigem Abstand oder keine Verzweigungen) und der thermischen Vorgeschichte abhängig. Härte und Festigkeit der Polymere nehmen mit wachsender Kristallinität zu. Das Resultat dieser DSC-Messung gibt daher direkte Hinweise auf die mechanischen Eigenschaften.

Verwendet wird ein Gerät von Mettler Toledo: DSC 311 (mit freundlicher Unterstützung des IBMB der TU-Braunschweig). Als Auswertungssoftware wird das Mettler Toledo STAR[®] Programm herangezogen. Die Probenmenge wird zwischen 5 und 15 mg gewählt, wobei in Abhängigkeit der Materialkonsistenz (Späne, Kapseln, watteartig) versucht wird, den Al-Tiegel möglichst zu füllen.

3.3.4.4 DSC-Messungen zur Bestimmung der Porengrößenverteilung

In die Mettler Toledo Alutiegel wird eine trockene Polymerprobe eingewogen. Dazu kommt eine gewisse Menge an bidest. Wasser. Die Menge an Wasser wird so gewählt, daß das Probengewicht in mg als Volumen in µl eingesetzt wird. Für eine Polymereinwaage von 6 mg werden 6 µl Wasser zugesetzt. Es hat sich gezeigt, daß die Menge an Wasser genau eingestellt werden muß. Zuviel Bulkwasser sammelt sich auf dem Boden des Tiegels und isoliert den Wärmestrom, der von der Schmelzpunktdegradation hervorgerufen wird, vom Sensor.

Verwendet wird ein Gerät von Mettler Toledo: DSC 311 (mit freundlicher Unterstützung des IBMB der TU-Braunschweig). Als Auswertungssoftware wird das Mettler Toledo STAR[®] Programm herangezogen. Die Wassermenge wird wie folgt gewählt: Pro eingewogenem mg Polymer werden 1,2 µl Wasser zugegeben. Also werden auf 10 mg Polymer 12 µl Wasser gegeben.

Die Berechnung der Porengrößen erfolgt mit der im theoretischen Teil abgeleiteten Formel (vgl. Abschnitt 2.2.4.3).

3.3.5 Ermittlung der Grenzflächenenergie Festkörper/Flüssigkeit durch Kontaktwinkelmessungen

3.3.5.1 Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkel der Tropfen auf der Oberfläche wurden aus Bildern bestimmt, die mit einer Kamera (Sony CCD 1115) aufgezeichnet und am PC mit einem Bildbearbeitungsprogramm (IrfanView) ausgewertet wurden.

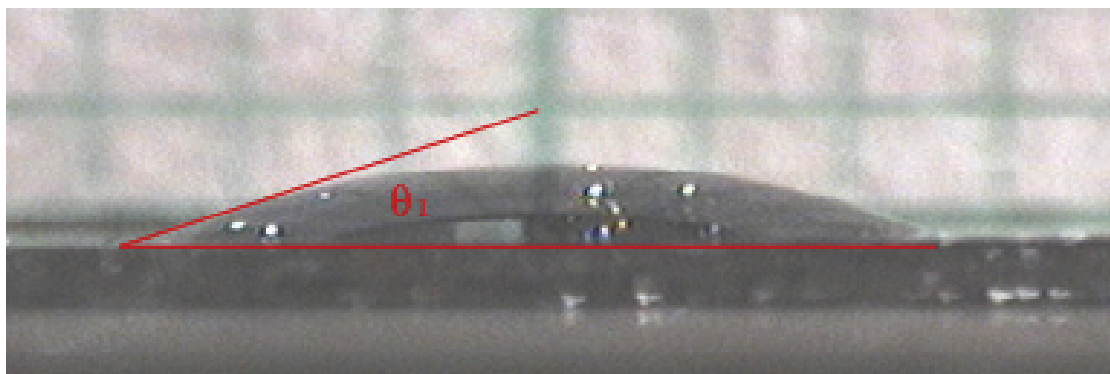


Abbildung 3-1: Grafische Ermittlung des Kontaktwinkels bei einer gut benetzenden Probe

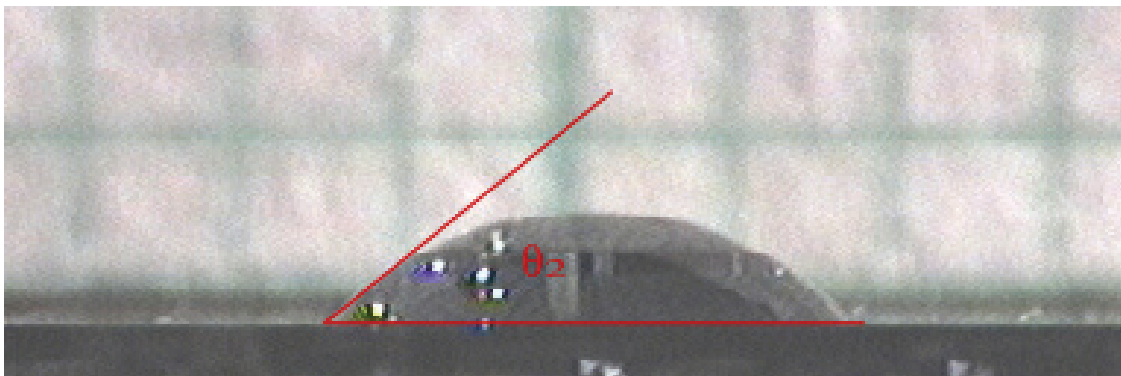


Abbildung 3-2: Grafische Ermittlung des Kontaktwinkels bei einer schlechter benetzenden Probe

Experimenteller Teil

Der Fokus der Kamera wird auf die Ränder der Tropfen scharf gestellt. Ein Bogen Millimeterpapier dient als Maßstab im Hintergrund, die Auswertung erfolgt geometrisch. Die Winkel werden am Bild auf dem Monitor bestimmt. Über das Millimeterpapier kann das Tropfenvolumen bestimmt werden. Die Berechnung erfolgt über das Volumen eines Kugelabschnittes.

$$V = \frac{1}{6}\pi h(3\delta^2 + h^2)$$

Formel 3-5

mit

δ Radius der Grundfläche [m]

h Höhe des Abschnitts [m]

Reproduzierbare Winkel wurden mit vorher fest vorgegebenem Volumen (6 μl) erhalten. Die in dieser Arbeit angegebenen Winkel wurden mit Festvolumen bestimmt. Die Berechnung des Kugelabschnittes dient zur Überprüfung, ob sich der Flüssigkeitstropfen auf einer runden Fläche ausgebreitet hat oder unregelmäßig verlaufen ist.

3.3.5.2 Ermittlung der Grenzflächenenergie

Die Kontaktwinkel werden wie oben beschrieben bestimmt. Dabei wird Wasser neben Ethylenglykol eingesetzt. Herangezogen wird die Owens-Wendt-Rabel-Kaelble-Methode (OWRK-Methode).

Die unterschiedlichen Kontaktwinkel werden, wie im theoretischen Teil beschrieben, über das geometrische Mittel aus dispersem und polarem Anteil der Oberflächenspannungen (σ_l^d, σ_l^p) der Flüssigkeit und dispersem und polarem Anteil der Oberflächenspannungen (σ_s^d, σ_s^p) des Festkörpers berechnet (vgl. Abschnitt 2.3.1).

3.3.6 AFM Messung an Silizium-Wafern

Die AFM Messungen werden mit einem Gerät der Fa. Nanoscope (Modell Nanoscope II) durchgeführt.

Nach der Montage der Proben auf dem Probenträger wird dieser in die Meßkammer gebracht. Der Laser wird auf den Cantilever justiert, daraufhin wird die Probe über drei Stellschrauben manuell vorpositioniert. Dabei werden die Arbeitsabläufe nach den Vorgaben des Handbuchs der Fa. Nanoscope Schritt für Schritt nachvollzogen. Die Annäherung an die Meßposition wird elektronisch vorgenommen. Der zuvor definierte Bereich wird dann abgerastert.

3.3.7 Prüfung der Biokompatibilität durch in-vitro Tests

Für die Zellkulturtests werden Endothelzellen (EC) und glatte Muskelzellen (SMC) benutzt. Es handelt sich dabei um Humanzellen der Fa. PromoCell bzw. des LEBAO, Hannover. Es wird das Wachstum der Zellen auf der Folienoberfläche untersucht, als Blindprobe wird das Wachstum auf einer Polystyrol-Petrischale gemessen. Zusätzlich wird der Einfluß der Eluate aus den Folien auf das Zellwachstum untersucht. Als weiterer Vergleich wird der Einfluß einer käuflichen HA-Folie (Fa. Jaloskin) auf das Wachstum der Zellen untersucht.

Die Zellkulturuntersuchungen wurden auf der Grundlage der Europäischen Norm EN 30993-5 (biologische Beurteilung von Medizinprodukten), zusammen mit dem Kooperationspartner LEBAO, Hannover, durchgeführt.

3.3.7.1 Verwendete Zellen

1. Aus humanen Arterien isolierte und charakterisierte glatte Muskelzellen und Endothelzellen (LEBAO, Hannover).
2. Käuflich erworbene Zellen von PromoCell GmbH, Heidelberg:

humane, arterielle Endothelzellen (HCAEC-p, C-12222), und humane arterielle glatte Muskelzellen (HCASMC-p, C-12512).

3.3.7.2 Verwendete Kulturmedien

Für die isolierten Zellen (LEBAO, Hannover):

EGM-2 (Endothelzellen) bzw. SMGM (glatte Muskelzellen) von Clonetics

+ 10% hitzeinaktiviertes FBS (Foetal Bovine Serum, Gibco BRL, Life Technologies)

+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x).

Für die käuflich erworbenen Zellen:

Endothelial Cell Growth Medium MV (Cat.-No.: C-22020) mit Supplement Mix

Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (Cat.-No.: C-22062) mit Supplement Mix

jeweils

+ 10% hitzeinaktiviertes FBS (Foetal Bovine Serum, Gibco BRL, Life Technologies)

+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

3.3.7.3 Kultivierung und Trypsinierung der Zellen

Die Behandlung wurde nach dem mitgelieferten Beipackzettel der FA. PromoCell durchgeführt.

(Abweichungen: Waschen der Zellen mit PBS statt HepesBSS; Trypsin/EDTA (10x) 1:10 verd., 40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$; Zentrifugation 10 Min., 1200 U/Min., RT)

3.3.7.4 Vitalitätstest (MTS-Test)

CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega.

Dieser Assay ist eine colorimetrische Methode zur Bestimmung der Zahl von lebenden Zellen. Das Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagenz enthält eine neue Tetrazolium Komponente [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] und ein Elektronenkopplungsreagenz (phenazine ethosulfate; PES). Die MTS Tetrazolium Komponente wird von den zu testenden Zellen durch NADPH oder NADH produziert, durch Dehydrogenase Enzyme in metabolisch aktiven Zellen in ein farbiges Formazanprodukt umgesetzt. Es wird CellTiter 96 AQueous One Solution Reagenz direkt in die Zellkulturwells gegeben, 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Menge des Formazan-Produktes, die als Absorption bei 490 nm gemessen wird, ist direkt proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen.

3.3.7.4.1 γ -Sterilisation der HA-Folien

Die Sterilisierung der Folien wurde von der Sterilisationsabteilung der MH-Hannover übernommen. Dort wurden die Hyaluronsäurefolien mit 100 Gy sterilisiert.

3.3.7.4.2 Waschen der Folien

Das folgende Waschprotokoll wurde bei allen Proben durchgeführt:

2 x mit Wasser (bidest.), je 2 Std.

1 x mit PBS, pH 7,4, über Nacht

2 x mit 1,2 M Na-Phosphatpuffer, pH 6,8, je 2 Std.

1 x mit PBS, 2 Std.

3.3.7.4.3 Herstellung von Flüssigextrakten aus Folien

Die Folien werden drei Tage bei 37 °C in 1 ml Zellkulturmedium (SMC- oder EC-Medium; Gibco BRL, Life Technologies) mit Serum inkubiert.

3.3.7.4.4 Prüfung der Flüssigextrakte

Die Zellen (SMC, bzw. EC) werden in 6-Well-Platten (1×10^5 Zellen/well; Fa. AQueous) bzw. 24-Well-Platten (2×10^4 Zellen/well; Fa. AQueous) ausgesät.

Am dritten Tag (Zellen sind subkonfluent) werden 1 ml Eluat und 1 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben.

Die Inkubationszeit beträgt jetzt weitere drei Tage bei 37 °C, während denen eine Sichtkontrolle erfolgt.

3.3.7.4.5 Direkter Kontakt

Zu diesem Test wurden zwei unterschiedliche Methoden durchgeführt:

1. Zellen auf Folie,
2. Folie auf Zellen.

Zu 1.: Die Zellen (SMC, bzw. EC) werden in Kulturschalen (Durchmesser: 3,1 cm, 1×10^5 Zellen/Kulturschale) direkt auf die Folien ausgesät. Die Inkubationszeit beträgt 7 - 8 Tage bei 37 °C.

Zu 2: Die Zellen (SMC, bzw. EC) werden auf Well-Platten (1×10^5 Zellen/well) ausgesät. Wenn die Zellen subkonfluent vorliegen, wird eine Folie auf den Zellrasen aufgelegt. Die Inkubationszeit beträgt dann weitere 3 Tage bei 37°C

4 Ergebnisse und Diskussion

Um die HA wasserunlöslich zu machen, wurden verschiedene Vernetzer und Vernetzungsstrategien verwendet. Dabei wurden vor allem niedermolekulare, bifunktionelle Reagenzien eingesetzt. Darüber hinaus wurde das Polysaccharid auch über polymeranaloge Umsetzungen funktionalisiert, um so zu einem polymeren Netzwerk zu kommen.

Die Strategie, die dabei verfolgt wurde und die auch schon im theoretischen Teil vorgestellt wurde, sah vor, Reaktionen zur Vernetzung zu verwenden, die zu Strukturen führen, wie sie auch in der Natur vorkommen. Dabei wurden Peptidbindungen, Esterbindungen und Disulfidbrücken hergestellt. Als Ausnahme kann hier die polymeranaloge Umsetzung der HA mit Methacrylsäureanhydrid gelten, bei der Esterbindungen zum Polymer geknüpft werden. Bei der eigentlichen Vernetzungsreaktion werden radikalisch C-C-Brücken generiert. Alternativ wurde die HA auch mit Itakonsäureanhydrid derivatisiert. Die Itakonsäure kann biotechnologisch erzeugt werden und wird bei der Immobilisierung von Enzymen benutzt. Sie ist also auf diesem Gebiet unbedenklich, da die Enzymaktivitäten oft nicht beeinflusst werden.

Im folgenden werden die unterschiedlichen Vernetzungsstrategien vorgestellt. Einen Sonderfall der Vernetzungsreaktionen stellen die ionothropen Gelbildungen dar. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß sie in bestimmten Salinitäten zu Zersetzung und damit zum Auflösen der Matrix neigen. Als bifunktionelle, chemische Vernetzer werden Glutaraldehyd und Diglycidylether verwendet. Anschließend werden die Nullängenvernetzer gezeigt, die, anders als die bifunktionellen Vernetzer, keine Spacergruppen in das Netzwerk einführen. Als Sonderfall der Vernetzungsstrategien werden die polymeranalogen Umsetzungen vorgestellt, die eine Vernetzung über einen Zwischenschritt herstellen.

4.1 Ionothrope Gelbildung

Über die ionothrope Gelbildung können Polyelektrolyte in eine unlösliche Form überführt werden, die dann zur Immobilisierung von Zellen genutzt werden kann. Das Alginat ist seit langer Zeit bekannt und gut untersucht. In dieser Arbeit wurde nach Möglichkeiten gesucht, die im theoretischen Teil schon diskutierten Nachteile des Alginats zu beheben.

4.1.1 Alginat als Polymermatrix

Alginat wird schon seit langem im Bereich der Biotechnologie zur Immobilisierung von ganzen Zellen eingesetzt, insbesondere wenn anfällige bzw. besonders empfindliche Zellen eingeschlossen werden sollen. Auch eine Zellbeladung in einem sekundären Schritt, wie beispielsweise die Befüllung eines Containers mit einer Zellsuspension, ist damit möglich. Darüber hinaus bietet das Alginat gute Einsatzmöglichkeiten bei Problemen der Oberflächenbeschichtung.

Ein großer Vorteil, den man sich bei der Verwendung von Alginat häufig zu Nutze macht, ist die einfache Formgebung der Gele, die aus ionothroper Gelbildung hervorgehen. Alginat kann mit reaktiven Stoffen, Polymeren oder Präpolymeren gemischt werden und übernimmt nur die Aufgaben der Formgebung, also der Ausbildung der für die Anwendung gewünschten Überstruktur. In einem zweiten Schritt werden dann die in der Alginatmatrix enthaltenen, reaktiven Gruppen zur Reaktion gebracht. Möglich ist in diesem zweiten Schritt das ganze Spektrum an Reaktionen, die sich zur Ausbildung von polymeren, biokompatiblen Netzwerken eignen. Nach diesem eigentlichen Vernetzungsschritt kann die Ca-Alginatmatrix durch bekannte Lösungen aufgelöst, sprich: entfernt werden. Geeignet sind Kochsalzlösungen, die das Gleichgewicht von unlöslichem Ca-Alginat zum löslichen Na-Alginat verschieben. Auf ähnliche Weise wirken auch Phosphatpuffer. Sie komplexieren das Calcium und machen so das Alginat löslich.

Durch diese Lösungsmöglichkeiten ist die alleinige Anwendung von Alginat aber auch beschränkt. In der medizinischen Anwendung, z. B. bei der Implantation, stößt

das Ca-Alginat auf eine Salinität, die einer 0,9 %igen Kochsalzlösung entspricht. Die Auflösung eines Containers würde schon durch Ionenaustausch stattfinden, bevor ein anderer Prozeß überhaupt beginnt. In der biotechnologischen Anwendung verhält es sich nicht anders, auch hier ist der Alginatinsatz an die Verwendung geeigneter Puffersysteme gebunden. Um die Einsatzmöglichkeiten des Alginats zu vergrößern, muß eine Möglichkeit der Stabilisierung gefunden werden.

Im folgenden wird beschrieben, wie das Alginat in einer polymeranalogen Umsetzung funktionalisiert wird, um nach der Formgebung durch ionothrope Gelbildung kovalente Bindungen zu knüpfen, die das Alginat in jedem Puffersystem stabil und unlöslich machen.

4.1.1.1 Funktionalisierung von Alginat zur Eröffnung neuer Anwendungsmöglichkeiten

Nach dem im experimentellen Teil beschriebenen Verfahren wurde Alginat mit Methacrylsäureanhydrid umgesetzt. Anschließend wurde das erhaltene Alginatderivat durch photoinduzierte, radikalische Reaktion zur Ausbildung eines kovalenten Netzwerkes gebracht. Das Verfahren verbindet einige Vorteile, es werden die Bioverträglichkeit und die guten Verarbeitungsmöglichkeiten des Alginats genutzt. Zusätzlich liegt damit ein Verfahren vor, durch das sich Alginat in Gegenwart von Na^+ und PO_4^{3-} einsetzen läßt.

Die Stabilität eines auf diese Weise nachträglich kovalent verknüpften Alginats im Vergleich mit einem durch ionothrope Gelbildung hergestellten Ca-Alginats ist in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle 4-1: Stabilitätsvergleich von Ca-Alginat und kovalent vernetztem Alginat in 0,9 %iger Salzlösung

<i>Probe</i>	<i>Zustand nach einer Std.</i>	<i>Zustand nach 12 Std.</i>
Natives Alginat	Probe hat sich aufgelöst	---
Alginat mit Methacryl- säureanhydrid derivatisiert und photochemisch vernetzt	Probe ist unverändert	Probe ist unverändert

4.1.2 Chitosan als Matrix

Chitosan kann durch ionothrope Gelbildung, zum Beispiel durch Natriumpolyphosphat, und durch einen pH-Shift in den basischen Bereich in die unlösliche Form überführt werden. Die unlösliche Form ist ungeladen und aminosubstituiert. Man kann damit im Basischen nicht von einem Polyelektrolyten sprechen. Im sauren pH-Bereich liegen die Aminosubstituenten quaternisiert vor, dementsprechend handelt es sich um einen Polyelektrolyten. Das Chitosan ist ebenso wie das Alginat an verschiedene Umgebungsanforderungen gebunden. Nachteilig ist im direkten Vergleich mit Alginat, daß Chitosan im sauren pH-Bereich löslich ist. Üblicherweise wird Chitosan mit Hilfe von 1 %iger Essigsäure in Lösung gebracht. Das schränkt das Anwendungsspektrum gerade im Hinblick auf anspruchsvolle Zellen ein.

Interessanter ist das Polyelektrolyt/Polyelektrolyt-Symplex-Gel. Hier handelt es sich um die Verbindung aus einem Polykation und einem Polyanion. Im Gegensatz zu den ionothropen Gelen, die durch niedermolekulare Verbindungen in ihre unlösliche Form gebracht werden, übernimmt hier ein ganzes Polymer die Funktion des Gegenions, mit dem Vorteil, daß höhere Salzkonzentrationen das Gel nicht mehr auflösen können. Die Polymere mit ihrer hohen Ladung pro Molekül können nicht durch einfachen Austausch ersetzt werden. Die mechanischen Eigenschaften und auch die aus der Literatur bekannten Bioverträglichkeiten liegen jedoch hinter denen des Alginats. Die Cell-Seeding-Anwendungen sind dabei nicht so entscheidend: Es

wurde kein geeignetes Verfahren gefunden, mit dem Oberflächen beschichtet werden können.

Einige mechanische Eigenschaften sind in der **Tabelle 4-2** aufgeführt. Als Probenkörper diente der im experimentellen Teil vorgestellte Schlauch.

Tabelle 4-2: Gegenüberstellung der Materialeigenschaften von Alginat, Chitosan und ihren Symplex-Vertretern

<i>Gel</i>	<i>Zugfestigkeit [N]</i>	<i>Quellfaktor</i>	<i>E-Modul [GPa]</i>
Alginat	1,36	4	$6,36 \cdot 10^{-7}$
Chitosan	0,68	3	$4,78 \cdot 10^{-7}$
Alginat/Chitosan Symplex	0,2	3	$7,56 \cdot 10^{-6}$

Die hergestellten Alginat /Chitosan Kapseln weisen eine geringere Elastizität auf als Ca-Alginat Kapseln, sind im Unterschied dazu aber in Gegenwart von hohen Natriumkonzentrationen ($\text{Na}^+ > 2 \text{ M}$) stabil. Die mechanischen Kenngrößen der Schläuche sind auf die hergestellten Kapseln übertragbar. Die verwendeten Einheiten sind in der Literatur gebräuchlich und wurden daher übernommen.

4.2 Bifunktionelle Vernetzer

Bei der Vernetzung durch niedermolekulare Verbindungen, sogenannte bifunktionelle Vernetzer, werden Polymerketten inter- oder intramolekular durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft, wobei sie unlöslich werden. Bei dieser Vernetzungsart tauchen die bei Hydrogelen, die durch ionothrope Gelbildung hergestellt wurden, beobachteten Probleme, wie z.B. pH-Wert-Anfälligkeit oder Austauschreaktionen bei gewissen Salinitäten, nicht auf.

Die verwendeten Reagenzien können die gleichen oder auch unterschiedliche reaktive Gruppen aufweisen. Die für die Netzbildung geeigneten Gruppen besitzen oft eine gewisse Reaktivität, die sich störend, in einigen Fällen auch toxisch

auf Zellen auswirkt. Die Reagenzien sind nur eingeschränkt einsetzbar, wenn die Matrix in Gegenwart der zu immobilisierenden Zellen aufgebaut werden soll. Ist ein solches Verfahren gewünscht, sollten etwa Enzyme an oder in der Zelle immobilisiert werden, ist vorab zu testen, ob die Vernetzungsreagenzien geeignet sind und wie weit ihr schädigender Einfluß reicht.

Soll ein Implantat als Zell- oder Wirkstoffträger designt werden, sind diese Probleme zweitrangig. Hier führt eine hohe Reaktivität dazu, daß Vernetzungsreagenzien abreagieren und nach Beendigung der Reaktion in einer inerten, unreaktiven und im besten Fall biokompatiblen Form vorliegen. Im folgenden werden die Materialien vorgestellt, die unter Verwendung der folgenden Vernetzungsreagenzien hergestellt wurden. Die Vernetzungsreagenzien waren

- Diisocyanate
- Diglycidylether (Diepoxide)
- Dialdehyde
- Divinylverbindungen

Als Polymere wurden wasserlösliche Polymerketten eingesetzt, von denen die Bioverträglichkeit bekannt ist, und die sich schon in vielen Anwendungen in oder am menschlichen Körper bewährt haben.

Als Beispiele für Vertreter mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen wurden das Epichlorhydrin und das Epibromhydrin eingesetzt. Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Methacrylverbindungen stellen ebenfalls Vertreter mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen dar. Als Polymerketten, die sich zur Vernetzung eignen, wurden natürliche und synthetische Polymere verwendet. Als natürliche Polymere wurden Polysaccharide, wie die schon erwähnte Hyaluronsäure, eingesetzt.

Eine Zusammenstellung ist in der folgenden Tabelle gegeben.

Tabelle 4-3: Übersicht über die Vernetzungsreagenzien und die biokompatiblen Präpolymere

<i>Wasserlösliches Polymer, besonders Polysaccharide</i>	<i>Vernetzungsreagenz</i>
Alginat	CaCl ₂ ; BaSO ₄ ; AlCl ₃
Chitosan	Na ₅ (PO ₄) _x
Hyaluronsäure	Siehe Abschnitt 3.1.1
Dextran	Epichlorhydrin
Polyvinylpyrrolidon	Divinylsulfon
Polyvinylalkohol	Mercaptopropionsäure
	Divinylsulfon
	Epichlorhydrin
Polyethylenglycol	Isocyanate
Collagen	EDC

Der Einfluß der Vernetzer wurde intensiv und systematisch bei Hyaluronsäure als natürlichem Polymer, welches besondere, medizinische Eigenschaften besitzt, untersucht. Hervorzuheben sind hier die antiinflammatorischen Eigenschaften der Hyaluronsäure. So konnte gezeigt werden, daß ein polymeres Netzwerk auf die an das Material gestellten Anforderungen maßgeschneidert hergestellt werden kann, um Wirkstoffe aufzunehmen, und daß ein Polymer so designt werden kann, daß die polymere Matrix schon Wirkstoffeigenschaften mitbringt.

Das folgende Diagramm zeigt das unterschiedliche Quellverhalten von vernetzter Hyaluronsäure. Mit den unterschiedlichen, difunktionellen Reagenzien können unterschiedlich quellfähige Materialien hergestellt werden. Die Quellfähigkeit ist bei vielen Anwendungen das entscheidende Kriterium. Bei koronaren Implantaten führt ein zu großes Quellverhalten zu Problemen, die für das Material als Ausschlußkriterium bei ansonsten guten Biokompatibilitätsbefunden gelten. Der Einfluß von Vernetzern auf die Netzwerkdicke und der Einfluß auf das Quellverhalten ist an anderer Stelle untersucht und ist nicht Gegenstand dieser Arbeit. Vielmehr war es das Ziel, polymere, biokompatible Materialien für die

gewünschten Anwendungen mit definierten Kriterien zu entwickeln. Dabei stellt das Quellverhalten nur einen Parameter dar, der von dem Werkstoff erfüllt werden soll.

Die genaue Vernetzerkonzentration bzw. die Stoffmenge pro Polymer oder Monomereinheit kann aufgrund einiger Verfahren nicht angegeben werden. Als Unsicherheit sind neben Verdunstungserscheinungen (Aceton über 12 Std.) auch Verluste durch die häufigen Spülschritte zu nennen. Im Falle der Glutaraldehydvernetzung wird die Vernetzerlösung nach 4 Std. und noch einmal nach 12 Std. getauscht. Über DC-Kartenanalytik kann gezeigt werden, daß die Vernetzerlösung an Glutaraldehyd verarmt, jedoch sinkt die Konzentration nicht auf Null ab. Bei den Verfahren, bei denen EDC oder Diepoxidverbindungen benutzt werden, müssen nicht zur Ausbildung einer Brücke zwischen Polymerteilen inter- oder intramolekular führen, sondern können auch durch Nebenreaktionen umgesetzt werden.

Bei der Analytik einer mit Glutaraldehyd vernetzten HA-Folie werden im IR-Spektrum noch Aldehydfunktionen bei 1760 cm^{-1} gefunden. Diese Banden verschwinden nach dem Fixierschritt mit Natriumcyanoborhydrid.

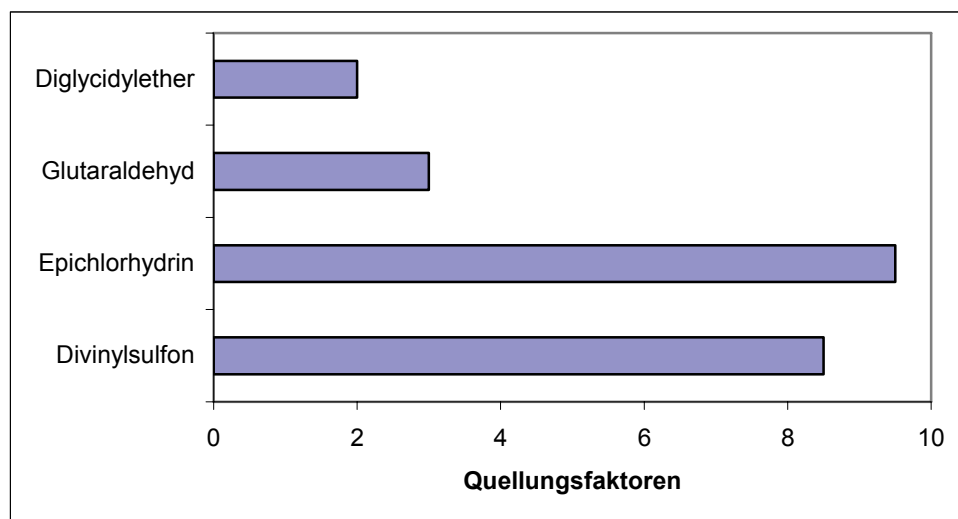


Abbildung 4-1: Quellungseigenschaften von unterschiedlich vernetzter Hyaluronsäure

Interessant ist das Quellverhalten vor allem unter dem Gesichtspunkt der Qualitätskontrolle. So stellt das Quellverhalten eine Meßgröße dar, durch die verschiedene Chargen miteinander verglichen werden können. Eine weitere

Meßgröße stellt das E-Modul dar, wobei hier ein definierter Prüfkörper nötig ist, um klare Aussagen über das Material treffen zu können.

4.2.1 Vernetzung mit Glutaraldehyd

Mit dem im experimentellen Teil beschriebenen Verfahren zur Folienherstellung gelang es, Stents zu beschichten und Folien für die Zellkultur herzustellen. Die Quellungseigenschaften der mit Glutaraldehyd vernetzten HA sind denen der Methacrylderivatisierung in der folgenden Abbildung gegenübergestellt.

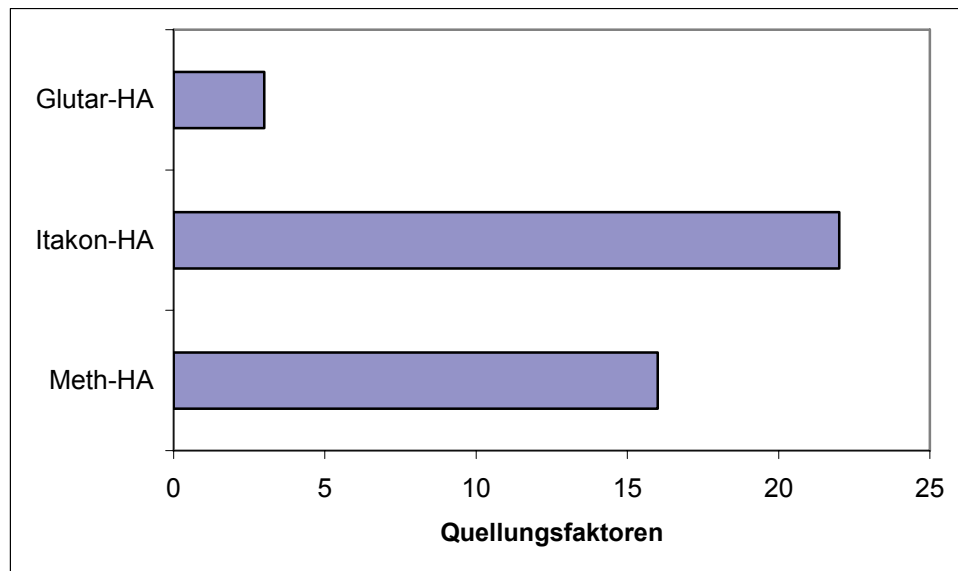


Abbildung 4-2: Unterschiedliche Quellungsfaktoren bei durch polymeranaloge Umsetzung derivatisierter HA und Vernetzung durch bifunktionelle Verbindung

Die Vernetzung mit Glutaraldehyd bringt eine deutliche Verbesserung der Quellungseigenschaften. Die Werkstoffe mit geringerer Quellung zeigen bessere Formstabilitäten. Die Stabilität der so erhaltenen Folien ermöglicht ihre Isolation und die Durchführung von Zellkulturtests.

4.2.2 Vernetzung mit Diglycidylether

Als Vernetzer wurde der Ethylenglycoldiglycidylether benutzt, der im folgenden nur als Diglycidylether bezeichnet wird.

Zur Vernetzung der HA mit der genannten Diepoxy-Verbindung müssen Reaktionsbedingungen von bis zu 60 °C und Basenkatalyse vorliegen. Es wurden Vernetzerkonzentrationen von 10 bis 50 Moläquivalenten, bezogen auf die Monomereinheit, eingesetzt. Dabei wurden Quellungsfaktoren von unter zwei erreicht, allerdings stellen die Reaktionsbedingungen bei dieser Methode ein Problem dar. Die guten Quellungseigenschaften und die damit einhergehende Stabilität konnten nur schlecht reproduziert werden. Die Folien erwiesen sich in den Zellkulturuntersuchungen als nicht stabil genug und lösten sich innerhalb eines Zeitraums von 10 Tagen auf.

4.2.3 Vernetzung mit Divinylsulfon

Der Vernetzungsmechanismus beruht auf einer nukleophilen Addition. Divinylsulfon ist ein difunktionelles, heteroanaloges Michael-Reagenz. Die beiden α , β -ständigen Vinylfunktionen werden von der elektronenziehenden Sulfongruppe aktiviert. Die Vernetzung erfolgt daher in einer Michael-analogen Addition der Hydroxylgruppen der HA an die Vinylgruppen des Divinylsulfons.

Die durch diese Vernetzung erhaltenen Materialien sind mechanisch sehr stabil. Folien können gut gehandelt werden. Die Zellkulturuntersuchungen sind in einem eigenen Kapitel zusammengefaßt (siehe Abschnitt 4.5) und erfüllen die an das System gestellten Bedingungen. Diese Bedingungen kann man knapp wie folgt zusammenfassen:

- Gutes Wachstum der Endothelzelle, was in der Praxis zu einem schnellen Einheilen des Implantats am Zielort führt.
- Verminderte Proliferation von glatten Muskelzellen, welches wiederum die Bedingung für eine geringe oder verminderte In-Stent-Restenose ist.

Ein Quellungsfaktor von drei ist für eine durch Divinylsulfon vernetzte Hyaluronsäure ebenfalls gering. Bei diesem Material kommt es zu einer deutlichen Abhängigkeit von der Materialvorbehandlung, der Materialgeschichte, und der Größe des

Quellungsfaktors. Wird das Material gleich nach der Vernetzung mit Wasser in Verbindung gebracht, quillt es extrem (Quellungsfaktor bis zu 12) auf. Wird nach der Vernetzung ein Trockenschritt eingebaut, bei dem das Material bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wird, sind die Quellungsfaktoren im Vergleich zum Herstellungsverfahren ohne Trockenschritt um Faktor 3 bis 4 kleiner.^[POUYANI94]

4.2.4 Vernetzung mit Epichlorhydrin

Die Vernetzung der HA mit Epichlorhydrin zeigt gegenüber den anderen Verfahren eine interessante Besonderheit. Die HA wird, wie im experimentellen Teil beschrieben, vernetzt, der unlösliche Zustand wird aber erst nach dem Trocknen erreicht. Die vernetzte Lösung kann durch das Dialysieren noch beliebig verdünnt werden. Beim Entzug von Wasser geht die HA (Epichlorhydrin), beim Überschreiten eines kritischen Feuchtigkeitsgehalts, vom Zustand der Lösung in den eines Hydrogels über.

4.3 Nullängenvernetzer (zero-length cross-linker)

Wie bereits erwähnt gibt es Vernetzungsreagenzien, die zu einer Kettenverbindung ohne zusätzliche Spacer-Gruppen führen. Dabei werden im Falle des EDC in Des-Diimidazolen Carbonylsäurefunktionen aktiviert, die dann mit Hydroxylen oder Aminen reagieren können, ohne daß Spacer eingeführt werden.^[LEE96]

4.3.1 EDC

Mit Hilfe des EDC kann eine Carbonylverbindung aktiviert werden, so daß bei Anwesenheit von Aminen Peptidbindungen geknüpft werden können. Das Verfahren eignet sich, um an Carbonylgruppen unterschiedlichste Funktionalitäten einzufügen. Beispiele hierfür sind die mit Aminosäuremethylester derivatisierten Hyaluronsäureproben. Diese Folien genügen allerdings nicht den benötigten

Anforderungen. So war die mechanische Integrität unzureichend. Die Materialien ließen sich darüber hinaus nicht auf Trägersubstrate (Glas, Si-C, med. Edelstahl) aufbringen.

4.3.2 Diimidazol

Anders als bei der EDC-Methode werden über das Diimidazol Hydroxylgruppen aktiviert, die dann mit Aminen ebenfalls zu Peptidbindungen weiterreagieren. Als Abgangsgruppe erhält man Imidazol. Die aktivierte Zwischenverbindung hydrolysiert unter Rückbildung einer Hydroxylgruppe und zu Imidazol.

Bei der Umsetzung der Hyaluronsäure nach der Imidazolmethode konnte kein brauchbares Implantat bzw. Beschichtungsmaterial erzeugt werden.

Die Quellungsfaktoren waren zu groß (>25), ebenso waren die erhaltenen Folien nicht mechanisch stabil. Die Auflösung der Folien geschah nach ca. 20 Std., so daß keine Zellkulturuntersuchungen möglich waren.

4.3.3 Einführung von Disulfidbrücken durch Mercaptopropionsäure

Das EDC gehört zu den Nullängenvernetzern. Bei dem hier aufgeführten Beispiel handelt es sich um eine polymeranaloge Umsetzung, die Aufgrund der Übersichtlichkeit beim EDC beschrieben wird.

Durch das EDC wurde die Carbonylfunktion der Mercaptopropionsäure aktiviert. Diese aktivierte Säurefunktion ist in der Lage, im wäßrigen Medium kovalente Bindungen mit Aminen und Hydroxylgruppen unter Ausbildung von Peptid- und Esterbindungen auszubilden.

Insgesamt waren die Folien von ihrer Stabilität und den Quellungsfaktoren her optimal. Die Quellungsfaktoren konnten im Bereich von 2,8 bis 12 eingestellt werden. Die Folien zeigten bei der Degradation in isotonischer Kochsalzlösung eine Halbwertszeit von 6 Monaten. Der Herstellungsprozeß, insbesondere die Ausbildung des Netzwerkes, dauerte aber 10 Tage, da keine Alternative zur Oxidation an Luft

gefunden wurde. Als Oxidationsmittel wurden neben der Raumluft unterschiedliche Mengen Wasserstoffperoxid eingesetzt, ohne daß hier ein wasserunlösliches Produkt erhalten wurde.

4.4 Polymeranaloge Umsetzungen an Polymeren

Analog zum Alginat lassen sich auch andere Polysaccharide durch Methacrylsäureanhydrid derivatisieren. Alternativ zum Methacrylsäureanhydrid eignet sich auch das Itakonsäureanhydrid. Es bietet den Vorteil, daß es aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden kann und zudem in der Enzymimmobilisierung^{[VAIDYA04a],[VAIDYA04b]} bereits eingeführt ist. Als Polysaccharid wurde in der vorliegenden Arbeit vor allem die Hyaluronsäure systematisch untersucht.

4.4.1 Funktionalisierung und nachträgliche Vernetzung von Polysacchariden

Wie bereits beim Alginat vorgestellt, wurde auch Hyaluronsäure mit Methacrylsäureanhydrid und Itakonsäureanhydrid derivatisiert. Das Hyaluronsäurederivat wurde im wäßrigen Medium mit dem Photoinitiator versetzt und zur Ausbildung des Netzwerkes belichtet. Nach 15 - 25 Min. war der Photoinitiator entfärbt, und das Netzwerk hatte sich gebildet. Das Quellverhalten des entstandenen Hydrogels wurde untersucht. Im folgenden werden in einem Balkendiagramm die Quellungsfaktoren von mit Methacrylsäureanhydrid derivatisierter Hyaluronsäure (Meth-HA), mit Itakonsäureanhydrid derivatisierter Hyaluronsäure (Ita-HA), mit Methacrylsäureanhydrid derivatisiertem Alginat (Meth-Alg) und mit Itakonsäureanhydrid derivatisiertem Alginat (Ita-Alg) verglichen.^{[SMEDS99],[SMEDS01],[TRUDEL02]}

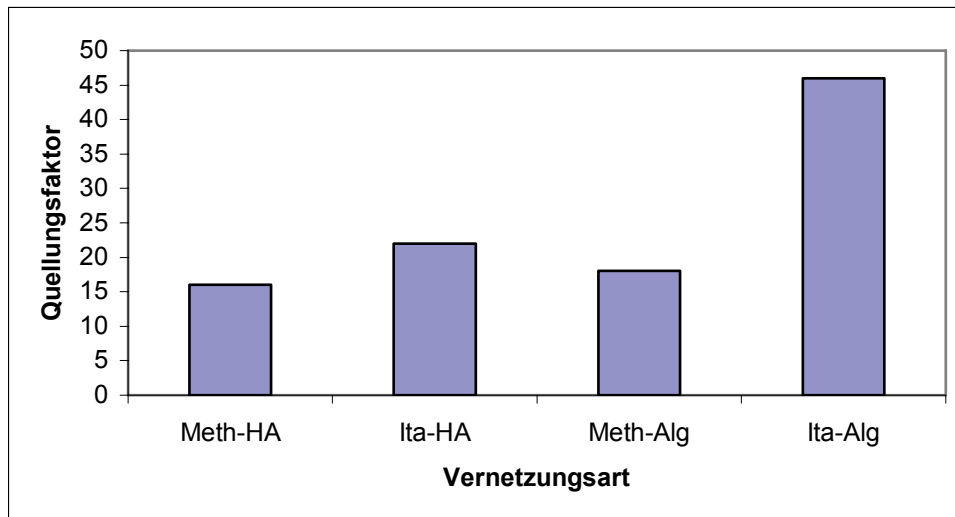


Abbildung 4-3: Vergleich der Quellungsfaktoren von HA und Alginat bei unterschiedlicher Derivatisierung

Deutlich ist zu sehen, daß itakonisierte und vernetzte Systeme höhere Quellungsfaktoren und entsprechend geringere Vernetzungsgrade aufweisen, als die methacrylierten und vernetzten Saccharidsysteme. Außerdem quillt vernetztes Alginat weniger als vernetzte Hyaluronsäure. Eine Erklärung ist das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Bindungstypen. Neben der kovalenten Bindung hat auch die ionothrope Wechselwirkung einen Einfluß.^[OERTHER99] Alginat läßt sich unter gleichen Bedingungen leichter, also zu höheren Netzwerkichten, vernetzen. Der Grund für diese Unterschiede ist in zwei verschiedenen Stufen des Vernetzungsprozesses zu sehen:

Die unterschiedlichen Polysaccharide Alginat und Hyaluronsäure können verschieden gut durch die polymeranaloge Reaktion derivatisiert werden. Die reaktiven Gruppen des Alginats können leichter mit dem Anhydrid reagieren als die der Hyaluronsäure.

Die Anhydride sind ebenfalls unterschiedlich reaktiv. Zum einen bezogen auf ihr Kopplungsvermögen am Saccharid, zum anderen bezogen auf die Fähigkeit der Netzworkebildung. Die Vinylgruppen von Methacrylsäureanhydrid und Itakonsäureanhydrid eignen sich unterschiedlich gut zur Vernetzung.

Eine andere Art, um Polymere polymeranalog umzusetzen, ist die Aktivierung, die im folgenden beschrieben wird. Hier werden chemische Gruppen, die für die gewünschte Reaktion zu unreaktiv sind, durch besondere Verfahren funktionalisiert

und potent gemacht, um unter den bestehenden Bedingungen Vernetzungsreaktionen einzugehen.

Gruppen, die aktiviert werden, sind im folgenden die Hydroxylgruppen und die Säurefunktionen der Glucuronsäure.

4.4.1.1 Ausbildung von Disulfidbrücken

Disulfidbrücken stellen eine bekannte Leitstruktur aus der Biologie dar. Sie kommen z.B. als Brücken in Enzymen vor. Ebenso bekannt ist das Vorkommen in der Reifenindustrie, wo bei der Vulkanisierung Schwefelketten gebildet werden.

4.4.1.2 Vernetzung der Hyaluronsäure mit Bromcyan (Autovernetzung)

HA wurde mit Bromcyan umgesetzt. Dabei werden an einem Zuckerbaustein je zwei Hydroxylgruppen intermediär zu Iminocarbonaten umgesetzt. An diesem aktivierten Komplex können dann primäre Amine koppeln. Hydroxylgruppen sind ebenfalls, wenn auch mit geringerer Aktivität, zur Reaktion fähig.

Mit dem Polysaccharid reagiert das Bromcyan unter Ausbildung eines aktivierten Komplexes, der dann mit Aminen zu Isoharnstoffen, Carbamaten und, bei entsprechender Reaktionsführung, zu den Imidocarbamaten führt.

Die Netzbildung wurde beobachtet, jedoch waren die mechanischen Eigenschaften, ebenso wie bei dem Modell mit Cystein, unzureichend. Die Materialien konnten nicht als Folie isoliert werden. Das Material war nur schwach vernetzt. Daher wurde zwar ein unlösliches Hydrogel erhalten, dieses besaß jedoch noch Fließeigenschaften.

4.4.1.3 Derivatisierung der HA mit Cystein

Es wurde angestrebt, mit dem Cystein ein körpereigenes Molekül zu benutzen, das bei Fragen der Biokompatibilität keine Probleme bereitet. Hier wurde erwartet, daß

mit Cystein derivatisierte Hyaluronsäure gut verträglich ist und im Falle ummantelter Implantate gut einheilt. Bei einer späteren Biodegradation würde Cystein kontrolliert abgebaut werden, unter Freisetzung von Metaboliten, die ebenfalls eine nachgewiesene Verträglichkeit aufweisen.

Die HA konnte mit Cystein derivatisiert werden. Eine Ausbildung von Disulfidbrücken und damit eine Vernetzung konnte nicht erreicht werden.

4.4.2 Funktionalisierung von Präpolymeren und radikalische Vernetzung unter Ausbildung eines Netzwerkes

4.4.2.1 Derivatisierung der HA mit Methacrylsäureanhydrid

Die hergestellten Folien waren gelartig elastisch. Stents konnten mit dem Material beschichtet werden. Krimp- und Dilatationsversuche mit entsprechend beschichteten Stents zeigten Massenverluste von bis zu 30 %. In Zellkulturtests erwiesen sich die Polymere als toxisch. Alternativ wurde versucht, die polymeranaloge Umsetzung mit Itakonsäureanhydrid durchzuführen, von der bekannt ist, daß sie bei der Immobilisierung von Enzymen zu keinen Aktivitätsverlusten führt.

4.4.2.2 Derivatisierung von Hyaluronsäure mit Itakonsäureanhydrid

Insgesamt war das erhaltene Material nicht geeignet, da keine ausreichende Stabilität und Festigkeit erreicht wurde. Beide Ketofunktionen des Itakonsäureanhydrids sind reaktiv. Daher können mit HA zwei Produkte gebildet werden, von denen eins als Hauptprodukt angesehen werden kann.

Die erhaltenen Folien waren sehr instabil, die Quellungsfaktoren lagen bei 20 bis 46, das heißt, daß die Folien im ungünstigsten Fall bis auf das 46-fache angeschwollen sind.

Die Quellungseigenschaften der unterschiedlich derivatisierten HA wurden in Abbildung 4-3 gezeigt

Insgesamt sind die Quellungseigenschaften und die Stabilitäten der Hydrogele zu gering. Die gezeigten Daten sind Ergebnisse einer Verfahrensoptimierung. So wurde bei einem 20-fachen molaren Überschuß gearbeitet. Die Temperatur von 5 °C und eine Reaktionsdauer von 16 Std. stellen eine Optimierung dar.

Bei einer geplanten Anwendung der vernetzten Polymere bei der Ummantelung von Koronarstents sind neben der mechanischen Stabilität auch Anforderungen an den Quellungsfaktor gestellt. Die Quellung muß sich in Grenzen halten, da auch Gefäße von 3 mm Durchmesser behandelt werden sollen. Der Stent mißt im undilantierten Zustand 1 bis 1,2 mm und wird über den Ballonkatheter auf den gewünschten Durchmesser aufgeweitet. Bei einer angestrebten Beschichtung von 100 nm sollte der Quellungsfaktor bis zu 5 betragen. Als Grenze wird der Schichtabstand der Polymerschichten im gekrimpten Zustand angenommen. Wird der Stent auf den Ballonkatheter gekrimpt, verringern sich die Abstände der Struds noch weiter, die Polymerschicht sollten sie dann auch im gequollenen Zustand noch nicht berühren.

4.5 Zellkulturtests

Nach diesen Herstellungsverfahren für Folien wurden Substrate für die Zellkulturuntersuchungen hergestellt. Bei der Restenose sind die glatten Muskelzellen (smooth muscle cells - SMC) von entscheidender Bedeutung, ebenso wie die Endothelzellen (EC). Während die EC die Einheilung des Fremdkörpers ins Gewebe bewirken, sind die SMC für die nach der Implantation zu beobachtenden Zellanhäufungen verantwortlich.

Bei einem Material, das die In-Stent-Restenose unterdrücken soll, ist ein Wachstum der EC erwünscht, während die SMC in ihrem Wachstum inhibiert werden sollen. Die Eigenwirkung der HA kann durch geeignete, im theoretischen Teil bereits genannte Wirkstoffe weiter gesteigert werden.

Als Vergleichswert wurde eine käufliche HA-Folie herangezogen, wie sie zur Abdeckung von Wundöffnungen benutzt wird.

Getestet wurden SMC und EC. Es wurden folgende Versuchsansätze durchgeführt:

- Zellen (SMC, EC) werden auf den Folien ausgesät,

- Folien werden über einen Zellrasen gedeckt,
- Eluate werden aus den Folien gewonnen und mit den Zellen inkubiert.

Zum Vergleich wurden die Zellen zusätzlich auf Petrischalen aus Polystyrol ausgebracht, das Wachstum (Proliferation) wird bei diesen Proben gleich 100 % gesetzt.

Getestet wurden

- mit Glutaraldehyd vernetzte HA-Folien, die mit NaBH_3CN fixiert wurden,
- mit Divinylsulfon vernetzte HA,
- eine käufliche HA-Folie der Fa. Jaloskin, wie sie bei Wundabdeckungen eingesetzt wird, und
- die Vergleichsproben auf Polystyrol (PS).

4.5.1 Zellwachstumsuntersuchungen bei Zellen auf Folien

In einem ersten Ansatz wurden Wachstumsuntersuchungen an Zellen, die auf Folien ausgebracht worden waren, vorgenommen.

Die folgende Abbildung zeigt das Wachstum von EC auf den unterschiedlichen Folientypen. Als Achsenbeschriftung wurden lediglich die Vernetzungsreagenzien genannt. Die Vernetzer beziehen sich auf Hyaluronsäure.

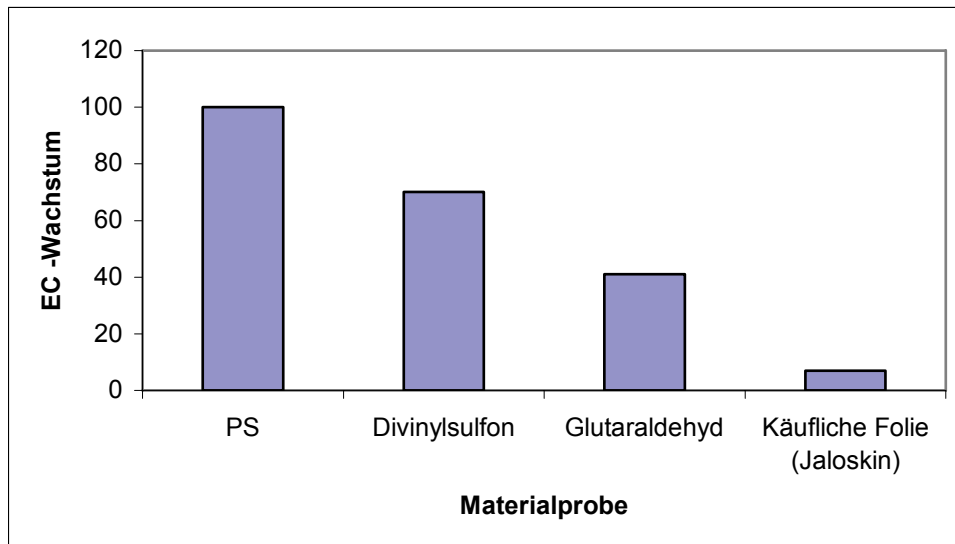


Abbildung 4-4: Vergleich des Wachstums von EC auf verschiedenen Materialoberflächen

Die mit Glutaraldehyd und die mit Divinylsulfon vernetzte HA zeigt gegenüber der Referenz eine Inhibierung der Proliferation. Bei den käuflichen Folien kann man von einem toxischen Einfluß auf die Zellen sprechen, hier liegt die Wachstumsfähigkeit bei unter 10 % bezogen auf den Vergleichswert.

Der Einfluß des Materials auf SMC ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

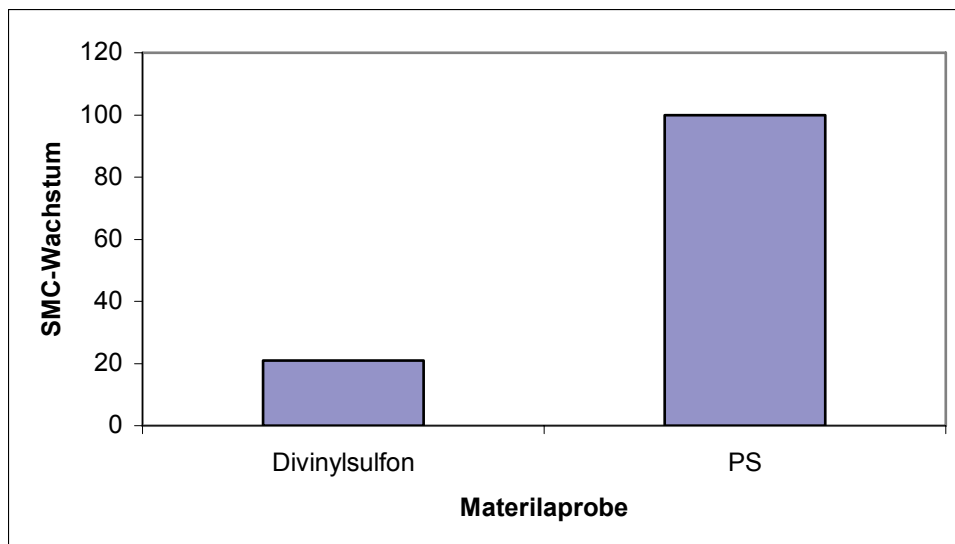


Abbildung 4-5: Proliferation von SMC auf Divinylsulfon im Vergleich zu PS

Die mit Divinylsulfon vernetzte HA zeigt nur einen geringen Einfluß auf die Proliferation von EC. Viel deutlicher ist aber die Hemmung der Proliferation der Folie

auf SMC. Das Wachstum der SMC wird durch die mit Divinylsulfon vernetzte HA deutlich gehemmt. Die mit Glutaraldehyd vernetzten Folien haben sich über die Dauer der Zellkulturtests aufgelöst.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine geringe Hemmung der EC vorliegt, die im Fall der mit Glutaraldehyd vernetzten HA deutlicher ist als bei den mit Divinylsulfon vernetzten HA-Folien. Die Proliferation der SMC wird von dem mit Divinylsulfon vernetzen HA-Material deutlich unterdrückt. Sowohl EC als auch SMC haften auf den Folien schlechter als auf Polystyrol. Dieser Unterschied hat bei der späteren Betrachtung der Ergebnisse einen starken Einfluß. So können Zellen durch den Wechsel der Pufferlösungen abgespült werden, die ansonsten eine gute Kompatibilität zu dem zu testenden Material besitzen. Um diesen Einfluß einzugrenzen, wurden weiterführende Experimente an Folien und auch an Eluaten durchgeführt, die im folgenden vorgestellt werden.

Als Vergleich folgen die Ergebnisse aus den Zellkulturuntersuchungen, bei denen eine vernetzte HA-Folie auf einen subkonfluenten EC- bzw. SMC-Rasen gelegt wird.

4.5.2 Zellwachstumsuntersuchungen mit Folien auf Zellrasen

Bei dieser Versuchsreihe wurden die verschiedenen Folien auf einem Zellrasen aufgetragen. Anschließend wurde das weitere Zellwachstum untersucht.

Das Wachstum der EC ist in der folgenden Abbildung gezeigt. Wieder wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Vernetzer genannt, die sich auf HA beziehen.

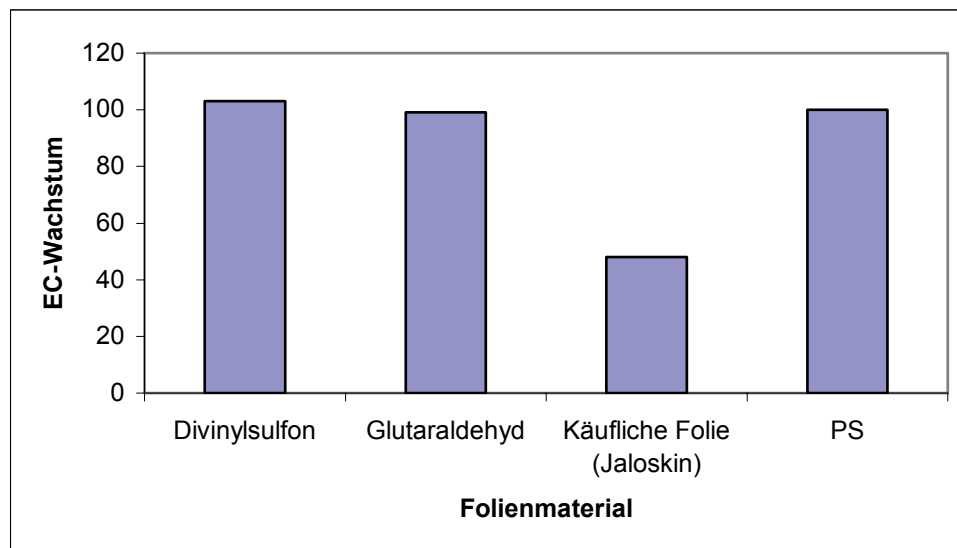


Abbildung 4-6: Wachstum von EC auf unterschiedlichen Oberflächen

Die Ergebnisse stellen sich etwas anders dar, als bei dem vorangegangenen Experiment, bei dem die Zellen direkt auf die Folien ausgebracht worden sind. Wieder ist der schädliche Einfluß der käuflichen Folien auf die EC zu beobachten. Die mit Divinylsulfon und die mit Glutaraldehyd vernetzten HA-Folien zeigen bei diesem Test keinen inhibierenden Einfluß auf die Zellen. Die Folien erreichen den Referenzwert.

Bei diesen Ergebnissen kommt ein anderer Parameter zum Tragen. Die Zellen erfahren durch die Folien eine Sauerstofflimitierung. Bei den im vorigen Abschnitt vorgestellten Ergebnissen war die Haftung auf der Oberfläche ein schwer abschätzbarer Parameter. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit den Folien auf einem gewachsenen Zellrasen geplant und durchgeführt. Beide Experimente zusammen ergeben dann ein klareres Bild von den proliferativen und den vitalen

Eigenschaften der Zellen, wenn sie mit dem zu testenden Material in Kontakt gebracht werden.

Die nachfolgende Abbildung zeigt den Einfluß der HA-Folien auf SMC. Dabei wurde die käufliche Folie nicht weiter untersucht, da die Wirkung auf EC zu schädlich erscheint. Ein Implantat würde zu langsam oder gar nicht in das Gewebe einheilen. Als Referenz dient wieder das Zellwachstum auf Polystyrol, also einfachen, unbehandelten Kulturschalen, deren Wachstum wiederum auf 100 % gesetzt wird.

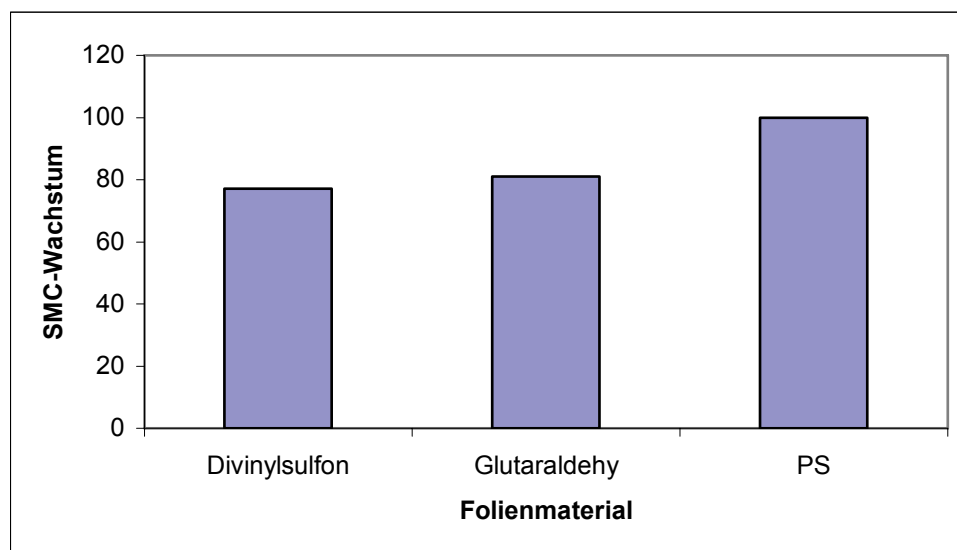


Abbildung 4-7: Wachstum von SMC auf unterschiedlichen Oberflächen

Sowohl die mit Divinylsulfon (77 %), als auch die mit Glutaraldehyd (81 %) vernetzten Folien zeigen einen inhibierenden Einfluß auf das Wachstum von SMC.

4.5.3 Zellwachstumsuntersuchungen mit Eluaten auf Zellrasen

Bei diesen Versuchen wurden die Eluate auf einen Zellrasen aufgetragen. Anschließend wurde wieder das weitere Wachstum der Zellen untersucht.

Die Ergebnisse aus den Eluaten und ihr Einfluß auf die Zellen sind in der folgenden Abbildung gezeigt. Wieder wird der Einfluß der Eluate zuerst auf die EC und dann auf die SMC gezeigt.

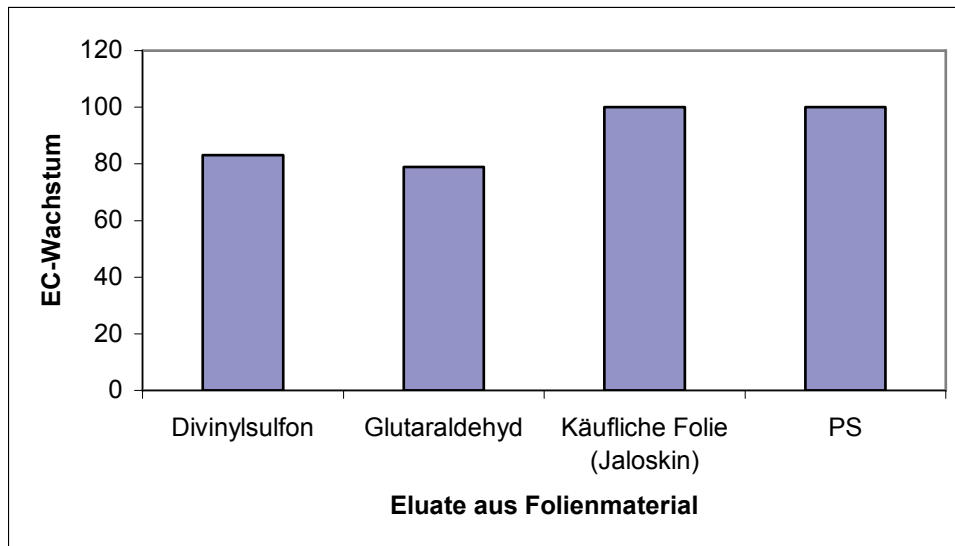


Abbildung 4-8: Wachstum von EC bei Kontakt mit Eluaten aus unterschiedlichen Folien

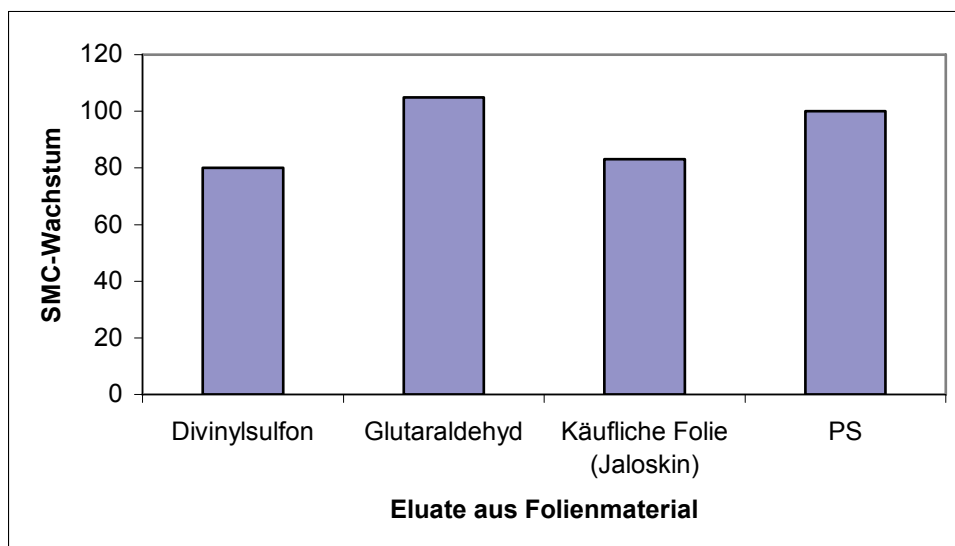


Abbildung 4-9: Wachstum von SMC bei Kontakt mit Eluaten aus unterschiedlichen Folien

Bei der Auswertung der Ergebnisse von den Zellkulturtests mit Eluaten stellt man fest, daß die käufliche Folie keinen Unterschied zur Referenz zeigt. Offensichtlich können durch Spülversuche keine löslichen Bestandteile in das Eluat überführt werden, die dann einen Einfluß auf das Zellwachstum haben. Die Eluate der mit Glutaraldehyd und der mit Divinylsulfon vernetzten HA zeigen beide einen Einfluß auf die Proliferation der EC.

Beim Wachstumstest an SMC erkennt man, daß die käufliche Folie, ebenso wie die mit Divinylsulfon vernetzten HA-Folien, einen kleinen, negativen Einfluß auf das Wachstum der SMC bewirken. Folien aus mit Glutaraldehyd vernetzter HA zeigen hingegen einen positiven Effekt auf das Wachstum der Zellen.

Bei den Eluationsstudien wird deutlich, daß die im experimentellen Teil vorgestellten Spülmethode evtl. doch nicht ausreichend sind. Hier liefert die Zellkultur wertvolle Hinweise, denn ein Material, das chemisch rückstandsfrei ist, kann medizinisch/biologisch noch mit Rückständen belastet sein. Dieser Effekt ist an die chemische Nachweismethode gekoppelt.

4.5.4 Korellation der unterschiedlichen Zellkulturansätze

Sehr deutlich waren die Unterschiede der Zellkultur bei den Experimenten, bei denen entweder die Zellen auf die Folien oder umgekehrt die Folien auf den Zellrasen gebracht wurden. Ein Grund dafür dürften die unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten der Zellen auf dem Untergrund sein. Falls, wie beobachtet, die Zellen auf PS besser haften als auf den sehr glatten Folien, können die Zellen bei einem Medienwechsel herausgespült werden. So könnte bei einem Zellverlust auf eine Hemmung der Proliferation geschlossen werden. Die Auswertung der Kulturschalen erfolgt über das Zählen der Zellen. Die schon erwähnte Sauerstofflimitierung stellt einen Parameter der Ergebnisbeeinflussung dar. Die Zellen haften nun einheitlich auf dem Schalenboden, erfahren aber einen Wachstums- und Vitalitätsverlust durch den durch die Folie verursachten Diffusionswiderstand für Sauerstoff.

4.6 Einfluß der Strahlung auf die Hyaluronsäure

Bei den Zellkulturtests wurden die Proben mit 100 Gy bestrahlt. Für medizinische Implantate ist vom Gesetzgeber eine Strahlendosis von 25 kGy vorgeschrieben. Um den Einfluß der β -Strahlung auf die HA zu testen, wurden HA-Proben mit unterschiedlichen Strahlungsdosen behandelt und durch Lichtstreuexperimente der

Einfluß auf die Kettenlänge bzw. die Molmasse untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt.

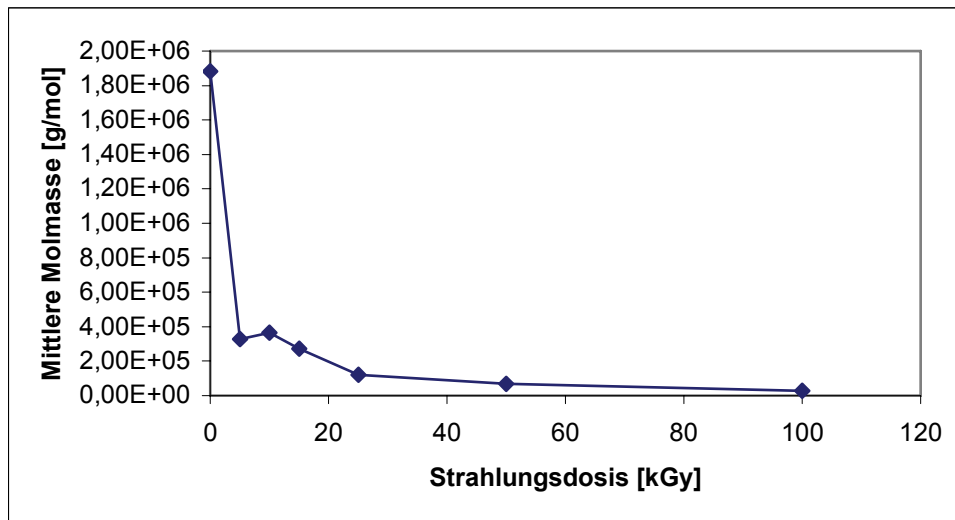


Abbildung 4-10: Einfluß der β -Sterilisation auf die HA

Der Molekulargewichtsabbau ist schon bei kleinen Strahlungs-dosen sehr hoch. Bei einer geforderten Strahlungs-dosis von 25 kGy beträgt die mittlere Molmasse ca. 100.000 g/mol. Das entspricht der HA-Größe, die in der Literatur^[PAPAKONSTANTINO98] mit antiinflammatorischen Eigenschaften in Verbindung gebracht wird. Die native HA besitzt ein mittleres Molekulargewicht von ca. 1,8 Mio. g/mol.

4.7 Untersuchungen an Haftvermittlersystemen

Im Anforderungsprofil der Beschichtungspolymere ist neben der Biokompatibilität und der mechanischen Belastung auch die ausreichende Haftung der Polymere auf dem Träger aufgeführt. Für ein medizinisches Implantat muß sichergestellt sein, daß das aufgebrachte Polymer auf dem Stent verbleibt und nicht auf dem Weg zum verletzten Gefäß verloren geht. Polymerfragmente oder Fetzen bergen für den Patienten enorme Gefahren. So können Embolien durch Polymerreste ausgelöst werden. Bei Beschichtungsversuchen der Hydrogele auf Stents, insbesondere von Stents mit einer amorphen Siliziumcarbidschicht, wurde festgestellt, daß Hydrogele auf metallischen Oberflächen nicht oder nicht ausreichend haften. Zur Überprüfung der Haftung wurden beschichtete Stents manuell (mit der Hand) auf Ballonkatheder

aufgebracht und danach mit 16 bar dilatiert. Die Hyaluronsäureschichten wurden im REM auf Beschädigungen untersucht.

Nachfolgend sind zwei REM-Bilder gezeigt bei dem ein Stent ohne Haftvermittler durch eine Tauchbeschichtung mit Hyaluronsäure geccoatet wurde (Glutaraldehydvernetzung)

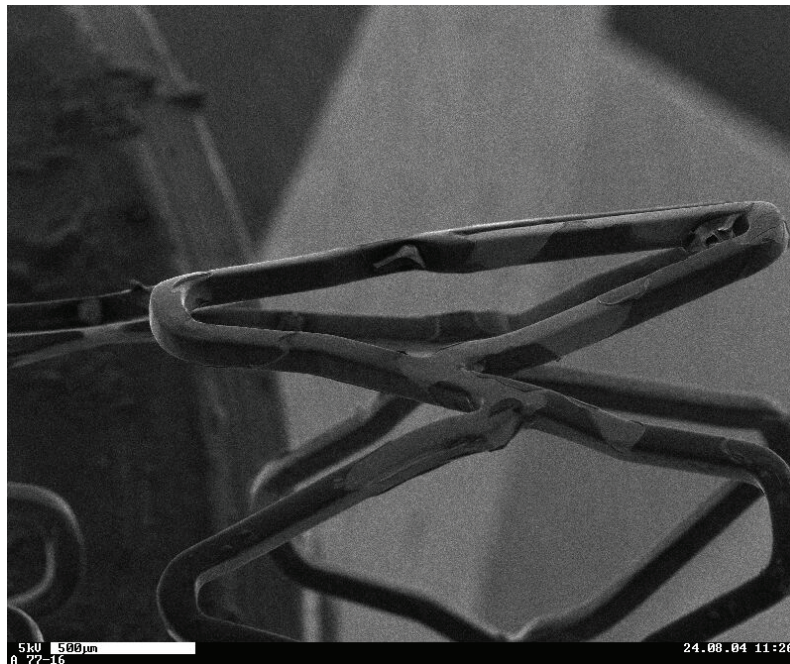


Abbildung 4-11: Stent mit HA beschichtung ohne Haftvermittler nach mechanischer Belastung

Bei größer Vergößerung sind im REM die Fehlstellen noch deutlicher zu erkennen, wie in der nächsten Abbildung gezeigt.



Abbildung 4-12: Ausschnittvergrößerung eines mit HA beschichteten Stents ohne Haftvermittler

Deutlich sind freie Areale und Ablösungen zu erkennen.

Ein weiteres Beispiel ist in folgender Abbildung gezeigt. Hier hat sich die HA-Schicht von einem Bogen komplett getrennt. Gut ist zu erkennen, daß die Polymerschicht an sich eine gute Materialintegrität aufweist.

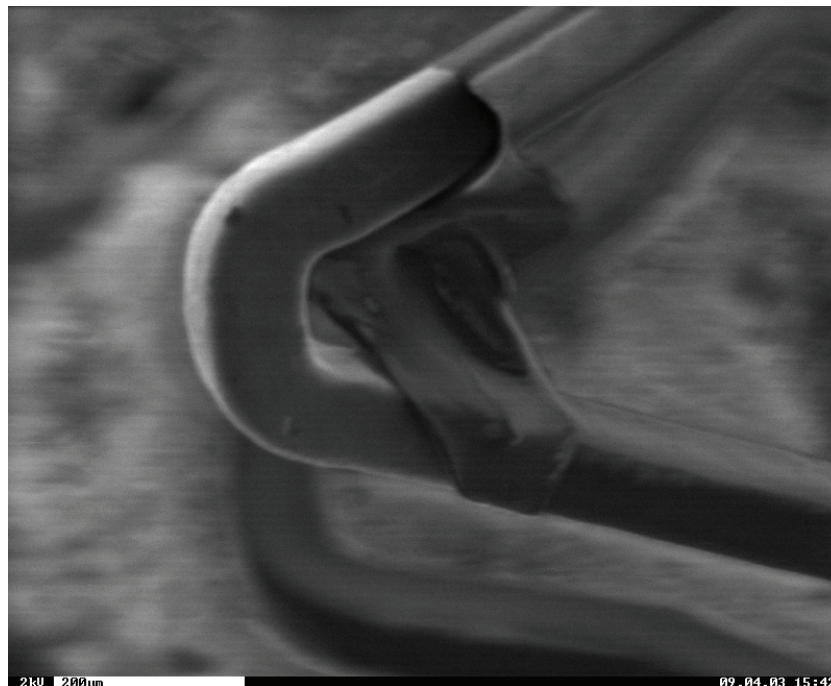


Abbildung 4-13: REM-Aufnahme eines mit HA beschichteten Stentsegmentes ohne Haftvermittler

Bei der Herstellung von Schläuchen wurde gerade diese Eigenschaft der Polymere ausgenutzt. Die Vernetzung wurde auf metallischen Oberflächen durchgeführt mit der Möglichkeit, die fertig vernetzten Polymere wieder vom Träger zu trennen. Die medizinischen Implantate, wie die verwendeten Koronarstents der Fa. Biotronik, werden nach dem Laserschneidprozeß durch Elektropolieren behandelt, es entsteht eine hoch vergütete Oberfläche, die kaum mehr Rauigkeiten aufweist. An diesen Schritt schließt sich die Goldbeschichtung an. Dazu wird der gesamte Stent mit einer Haftgoldschicht versehen. Auf dieses Haftgold, das ebenfalls als Haftvermittler dient, wird eine Golddeckschicht aufgebracht, allerdings nur auf den beiden Enden. Der Stent ist jetzt vollständig vergoldet. Der Stent wird nun für eine genau festgelegte Zeit in ein Cyanidbad gebracht, um das neu abgeschiedene Gold wieder zu lösen. Die Zeit wird dabei so gewählt, daß im Mittelteil die Goldbeschichtung vollständig verschwindet. Der Stent liegt am Ende dieser Prozedur mit vergoldeten Enden und freiem, metallischem Mittelteil vor. Im Anschluß daran erfolgt die Herstellung der amorphen Siliziumcarbidschicht. Diese wird in einem CVD-Verfahren unter Verwendung eines Hochfrequenzplasmas (13,5 MHz) abgeschieden. Als Prozeßgase dienen Phosphin, Silan und Methan. Die aus diesen Prozessen resultierende Oberfläche ist nicht nur glatt, sondern auch chemisch weitestgehend inert. Für das Anbringen einer weiteren, funktionellen Schicht stehen weder Oberflächengegebenheiten noch chemische Bindungsmöglichkeiten zur Verfügung.

Bei der Polymerbeschichtung von Stents ist es daher unerlässlich, eine Haftvermittlerschicht auf den Stent aufzubringen. Hier bieten sich verschiedene Möglichkeiten:

- Strukturgebung der Oberfläche (Erhöhung der Rauigkeit)
- Phosphatierung der Oberfläche
- Oxalierung der Oberfläche
- Funktionalisierung der Oberfläche, d.h. Anbindung von Ethoxy- oder Methoxysilanen mit reaktiven Gruppen
- Aufbringen eines Plasmapolymers

Die Phosphatierung und die Oxalierung sind Möglichkeiten, metallische Oberflächen zu derivatisieren. Sie versagen aber bei einer Keramik wie dem Siliziumcarbid. Eine

Aufrauung der Oberfläche ist bei dieser Halbleiterschicht auch nicht ohne weiteres möglich. Das Siliziumcarbid ist chemisch sehr inert und kann nur mit Fluoriden, wie z.B. Flußsäure, angegriffen werden. Selbst gegen reaktive Sauerstoffverbindungen ist Siliziumcarbid inert.

Es wurde ein Verfahren gefunden, um durch Verwendung der Plasmatechnik die Oberfläche zielgerichtet zu ätzen. Dazu wird ein Teflonblock (PTFE) in den Rezipienten gelegt und ein Sauerstoffplasma gezündet. Während des Prozesses werden Fluoridionen aus dem Teflon geschlagen, die im Sauerstoffplasma intermediär das Fluordioxid bilden. Dieses reagiert dann mit siliziumhaltigen Oberflächen zu dem gasförmigen SiF_4 , das aus dem Plasmaraum entfernt wird.

4.7.1 Aktivierung und Reinigung von Oberflächen durch Plasmabehandlung

Entscheidend für Oberflächenbeschichtungen ist neben der Oberflächenenergie die Rauigkeit der Oberfläche. Ätzmethoden stellen einen gangbaren Weg dar, um Oberflächen für eine Beschichtung vorzubereiten. Ziel einer solchen Behandlung ist es, die Oberfläche durch den Ätzschritt zu vergrößern. Die größere Rauigkeit ermöglicht es der Deckschicht, sich an das Substrat zu „klammern“, und ermöglicht dadurch eine größere Haftkraft der Schicht zum Substrat. Plasmaverfahren stellen eine Möglichkeit dar, um die Oberfläche aufzurauen.

Verschieden behandelte Proben wurden mit dem Rasterkraftmikroskop im Constant-Height-Modus betrachtet. Zum besseren Vergleich der Bilder wurde bei gleicher Auflösung (z-Achsenauslenkung) gearbeitet.

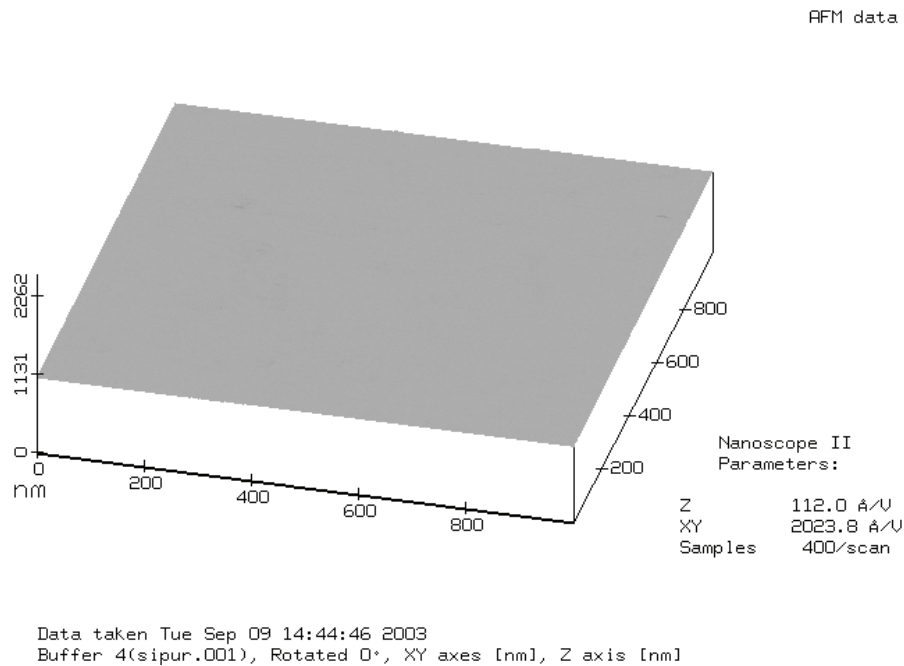


Abbildung 4-14: Silizium, unbehandelt

Das unbehandelte und gereinigte Silizium hatte eine glatte und homogene Struktur. Unregelmäßigkeiten zeigten sich erst bei sehr viel höheren Auflösungen. Bei den Wafern handelte es sich um oberflächenvergütete Substrate, wie sie für die Halbleitertechnik eingesetzt werden. Es handelte sich um Bor-dotierte (p-dotierte) Siliziumwafer mit einer Konzentration von 10^{16} Boratomen pro cm^3 in [111]-Orientierung. Nachfolgend werden die Ergebnisse von unterschiedlichen Oberflächenbehandlungsverfahren gegenübergestellt.

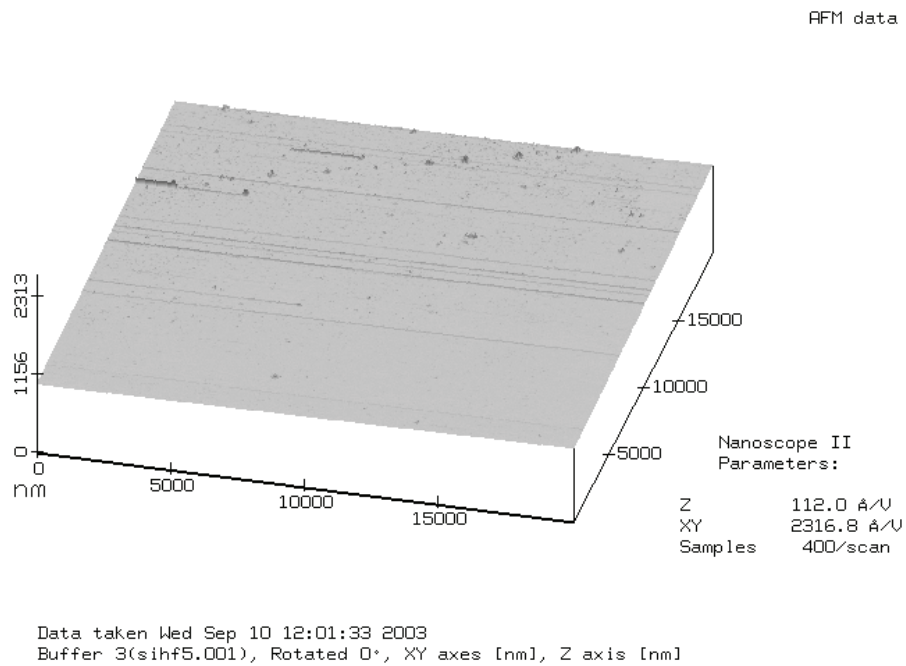


Abbildung 4-15: Silizium, 5 Min. in Flußsäure

Die chemische Ätzung mit Flußsäure hinterließ minimale Spuren an der Oberfläche, die kaum von Verschmutzungen zu unterscheiden waren. Die geringe Ätzwirkung der Flußsäure ist auf die sehr homogene Oberfläche zurückzuführen. Aufgrund der Einkristallstruktur des Wafers kommt es zu keinen Potentialdifferenzen, wie sie z.B. an Korngrenzen auftreten. Aufgrund der geringen Wirkung und den Problemen beim Händeln von Flußsäure erscheint diese Methode als nicht geeignet.

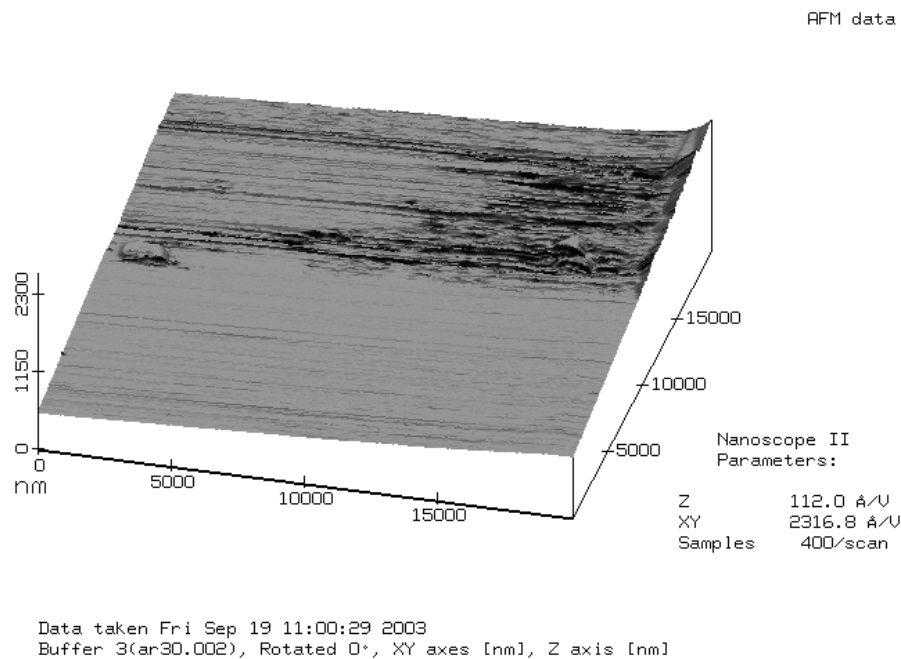


Abbildung 4-16: Silizium, Argon-Plasma, 200W, 30 Min.

Eine Plasmabehandlung mit Argon-Gas rauht die Oberfläche deutlich auf. Ob es sich bei dem abgetragenen Material allerdings um Schmutz, Oxidschicht oder Silizium handelt, kann mit dem verwendeten Verfahren nicht unterschieden werden. Trotz der langen Prozeßdauer von einer halben Stunde ist der Effekt gering.

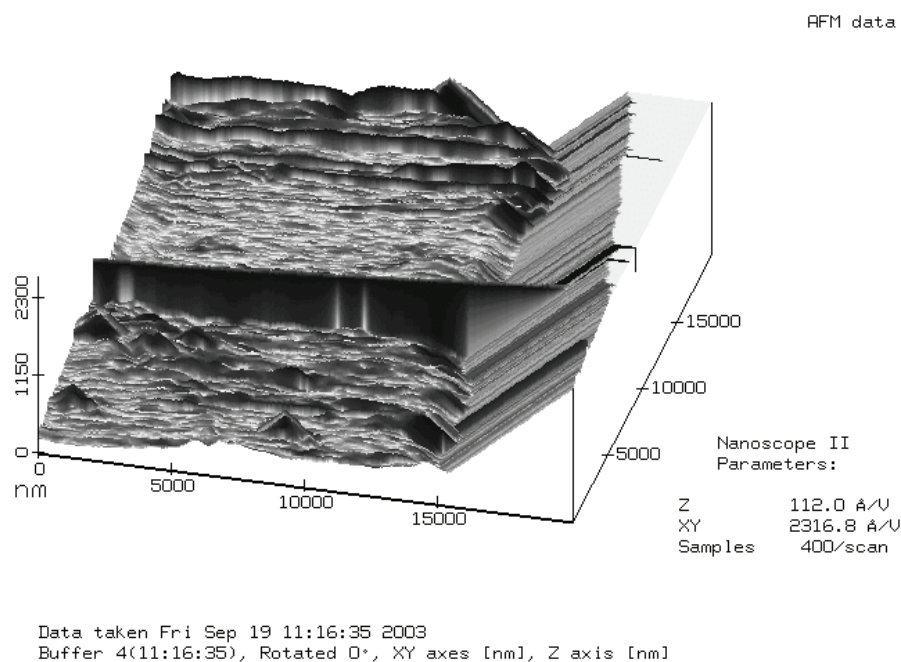


Abbildung 4-17: Silizium, Argon-Plasma, 200W, 30 Min. unter Zugabe von Teflon (PTFE)

Die Zugabe eines Teflonblocks (PTFE) in den Rezipienten sorgte für eine erhöhte Ätzwirkung. Die freigesetzten, aggressiven Fluor-Ionen griffen die obere Schicht an. Die geraden Strukturen in der Aufnahme sind Artefakte, die von fehlerhafter Abtastung herrühren. Schmutz-/Oxidpartikel können dafür verantwortlich sein. Das Argon-Plasma allein vermag die Oberfläche nur in geringem Maße anzugreifen. Bei Anwesenheit von PTFE sind es die Fluor-Ionen (-Radikale), die vom Argonplasma „freigesputtert“ werden, die die Ätzwirkung besitzen.

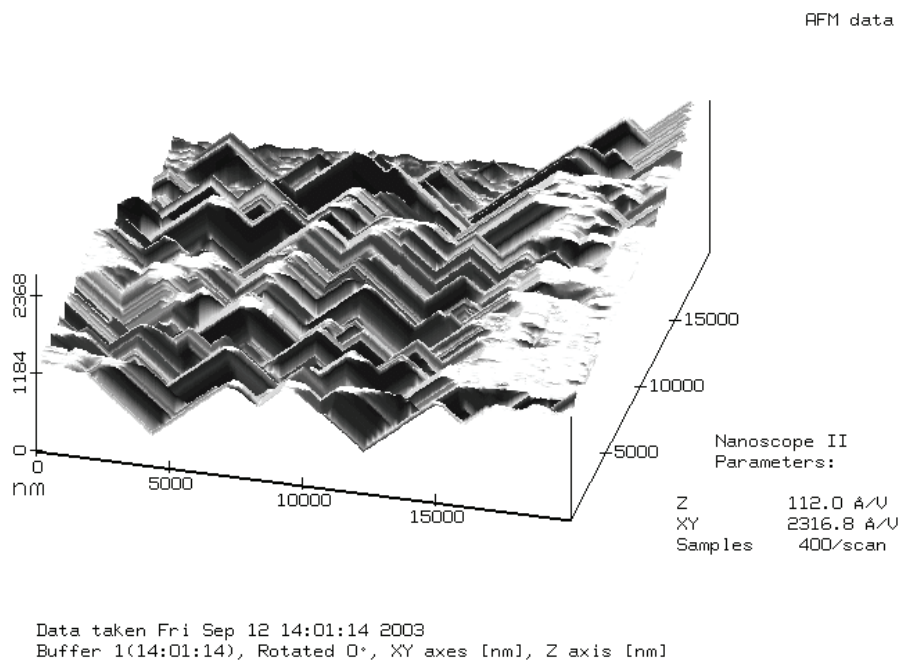


Abbildung 4-18: Silizium, Sauerstoff-Plasma, 200W, 15 Min. unter Zugabe von Teflon (PTFE)

Die Verwendung eines Sauerstoffplasmas anstelle des Argonplasmas in Gegenwart von PTFE führte schon nach der Hälfte der Prozeßzeit zu größeren Effekten. Hier war teilweise die gesamte oberste Schicht abgetragen und die Kristallstruktur eindeutig zu erkennen. Verantwortlich dafür sind die intermediär gebildeten Fluoridoxide (F_2O , O_2F), die eine deutlich reaktivere Spezies darstellen als die Fluorid-Ionen/-Radikale.

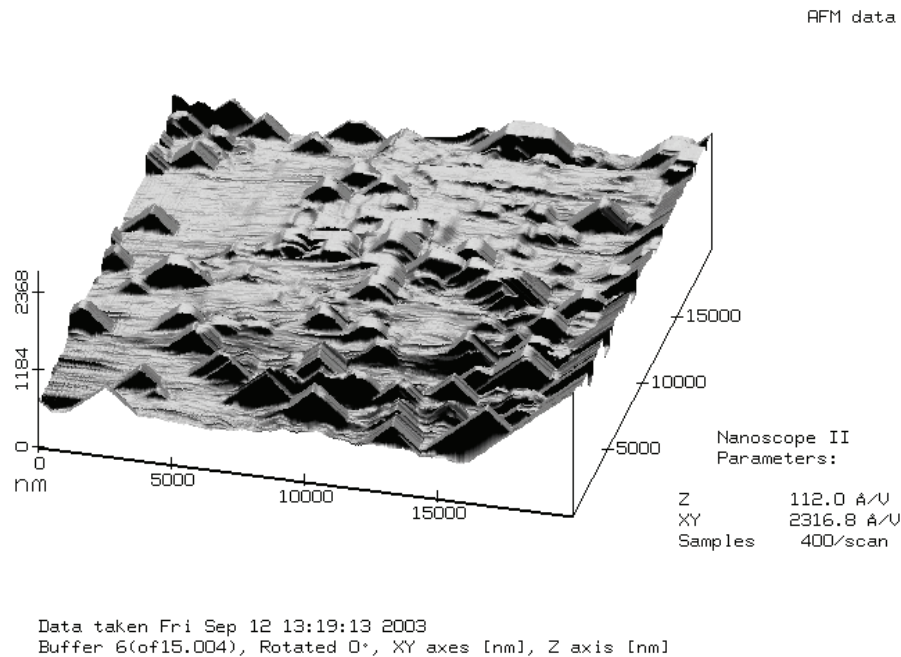


Abbildung 4-19: Silizium, Sauerstoff-Wasser-Plasma, 200W, 15 Min. unter Zugabe von Teflon (PTFE)

Die Verwendung eines Sauerstoff-Wasser-Plasmas anstelle des reinen Sauerstoffplasmas in Gegenwart von PTFE führte bei gleicher Prozeßdauer zu anderen Effekten. Das Sauerstoff-Wasser-Plasma trug Teile der obersten Schicht ab, jedoch weniger als bei Abwesenheit von Wasser im Rezipienten. Darunter kam eine kristalline Struktur zum Vorschein. Wasser wirkt als Moderator und vermindert den Ätzeffekt auf das Substrat. Über den Wassergehalt läßt sich die Ätzwirkung zielgerichtet einstellen. Diese Methode ist deshalb besonders geeignet, um gezielt bestimmte Rauigkeiten einzustellen. Das Wasser scheint in diesem Prozeß eine Oxidschicht aufzubauen, die den Angriff der aggressiven Ionen vermindert.

4.7.2 Haftvermittler auf Silanbasis

Auf die Notwendigkeit der Verwendung von Haftvermittlern wurde schon in Kapitel: 4.7 eingegangen. Es konnte gezeigt werden, daß die Schicht ohne Haftvermittler nicht auf der Stentoberfläche haftet. Es kommt zu flächigen Ablösungen. Im Gegensatz dazu führt eine Vorbehandlung der Stents mit Trimethoxypropylaminosilan zu haftenden Schichten.

Zum Überprüfen der mechanischen Stabilität der Polymerschicht und der Schichthaftung auf dem Stentgrundkörper, wird der Stent auf einen Ballonkatheter aufgekrimpt. Anschließend wird der Ballon mit 16 Bar dilatiert. Nach dem Entlüften des Ballons kann der Stent abgenommen und im REM analysiert werden.

In den folgenden Abbildungen sind REM-Aufnahmen HA-beschichteter Stents gezeigt, die eine Haftvermittlerschicht entsprechend den Ausführungen in Kapitel.: 2.3.3 erhalten haben.

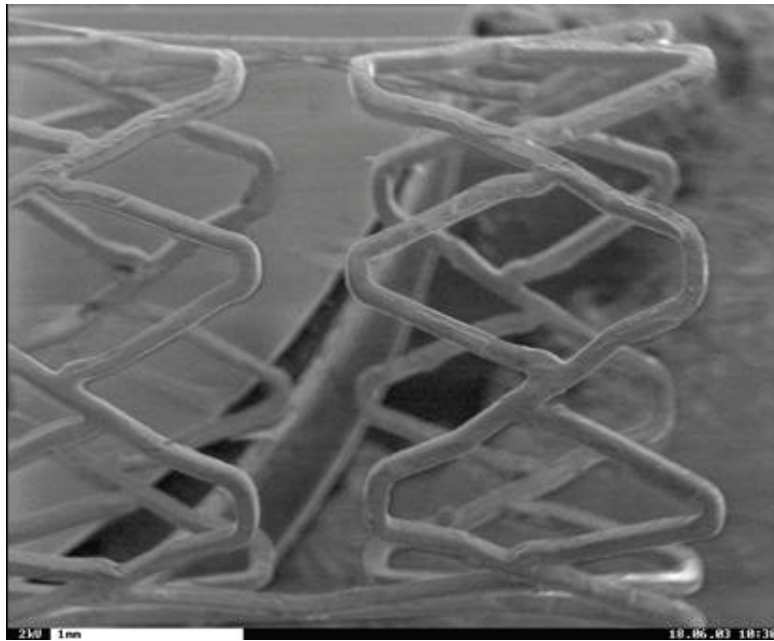


Abbildung 4-20: Mit HA beschichteter Stent mit einer Haftvermittlerschicht auf Basis eines Aminosilans

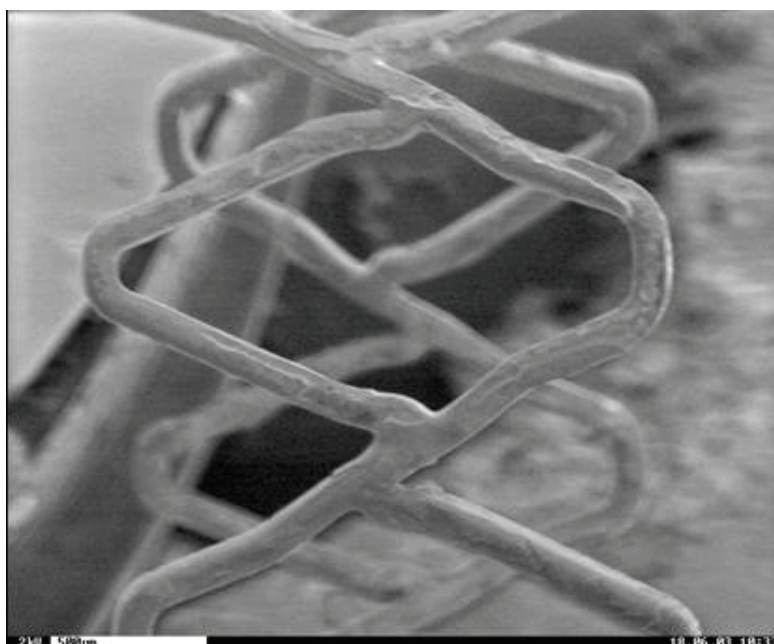


Abbildung 4-21: Ausschnittvergrößerung eines mit HA beschichteten Stents mit Aminosilan Haftvermittler

Sowohl im Überblick als auch bei der Ausschnittvergrößerung sind keine Fehlstellen, Abplatzungen oder sonstige Unregelmäßigkeiten zu erkennen.

Die folgende Abbildung zeigt die intakte Schicht selbst bei mechanischer Überbelastung (für die Aufnahme wurde ein Segment gebogen).



Abbildung 4-22: REM-Aufnahme eines mit HA beschichteten Stentsegmentes mit Haftvermittler auf Silanbasis

Durch die Entwicklung der Haftvermittlerschicht auf Silanbasis steht nun eine Möglichkeit zur Verfügung, um Hydrogele dauerhaft auf Oberflächen zu fixieren.

4.7.3 Plasmatechnische Verfahren

Eine viel genutzte Möglichkeit der Oberflächenaktivierung oder –funktionalisierung stellt die Plasmatechnik dar, die gerade im medizintechnischen Sektor immer mehr an Bedeutung gewinnt.

4.7.3.1 Plasmapolymerisierung

Die Plasmapolymerisation ist ein Verfahren, bei dem sich gasförmige Monomere, angeregt durch ein Plasma, auf frei wählbaren Substraten als hochvernetzte Schicht niederschlagen. Voraussetzung für diesen Prozeß ist das Vorhandensein von kettenbildenden Atomen wie Kohlenstoff, Silizium oder Schwefel im Arbeitsgas. Da die Monomermoleküle im Plasma zum großen Teil zu reaktiven Teilchen zerschlagen werden, bleibt die chemische Struktur des Ausgangsgases im Produkt höchstens partiell erhalten, was Vernetzung und ungeordnete Struktur zur Folge hat. Strukturergibt und Vernetzungsgrad lassen sich über Prozeßparameter wie Druck, Arbeitsgasfluß und eingespeiste elektrische Leistung steuern.

Aus dem Entstehungsmechanismus von Plasmapolymeren ergeben sich besondere Schichteigenschaften, die sie für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet machen:

- Hervorragende Schichthaftung auf fast allen Substraten,
- Erhöhung der chemischen, mechanischen und thermischen Stabilität,
- Hohe Barrierenwirkung.

Nach Anwendung plasmapolymerer Beschichtung ergeben sich:

- Kratzresistentere Beschichtungen,
- Hoher Korrosionsschutz,
- Antihafende, schmutzabweisende Beschichtungen,
- Funktionalisierte Oberflächen, um ausgewählte, chemisch reaktive Gruppen zu erhalten.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Plasmatechnik bei der Erhöhung der Rauigkeit von Oberflächen. Eine vielfach eingesetzte Methode in der Halbleitertechnik bei der Ätzung von Siliziumcarbid ist die Verwendung von SF_6 und O_2 als Synthesegas im Plasmaprozeß. Hier entsteht im Rezipienten das hochreaktive OF_2 , das mit der SiC-Schicht reagiert. Es bildet sich SiF_4 als gasförmiges Produkt, das aus dem Rezipienten entfernt wird. Eine schonendere Methode stellt die schon im

experimentellen Teil vorgestellte Technik dar, bei der Teflon (PTFE) in den Rezipienten eingebracht wird.

4.7.3.2 Plasmaätzung und Plasmaaktivierung

Substrate können durch ein Plasmaverfahren aktiviert werden. Dazu können durch ein Argonplasma Radikale auf der Oberfläche erzeugt werden, die dann durch eine nachgeschaltete Reaktion genutzt werden. Zusätzlich kann durch ein Plasma eine Oberfläche zielgerichtet aufgeraut werden. Der Unterschied zwischen einer Plasmaaktivierung und einer Plasmaätzung liegt zum einen in der Prozeßdauer. So wurden die Aktivierungen von Substraten über 30 bis 40 Sek. durchgeführt. Die Plasmaätzungen benötigen eine Prozeßdauer von 5 bis 30 Min. Ein anderer Unterschied besteht darin, daß Ätzungen eine Spezies im Plasma benötigen, die chemisch mit dem Substrat reagiert. SiC kann, wie oben beschrieben, mit O_2/SF_6 behandelt werden. Allgemein werden Plasmaätzungen an Si- oder SiO_2 -Oberflächen mit fluorhaltigen Synthesegasen betrieben.

Für die Herstellung einer Plasmapolymerschicht kommen eine Vielzahl von Precursoren in Frage. Als Precursor werden die Substanzen bezeichnet, die im gasförmigen Zustand in den Rezipienten eingeleitet werden. Dabei kann der Precursor durch das angelegte Vakuum selbständig bei Raumtemperatur verdampfen. Bei schwerflüchtigen Precursoren ist es möglich, diese zu heizen, um genug Moleküle im Rezipienten zu erhalten, so daß der Plasmazustand bestehen bleibt, also das Plasma „brennen bleibt“.

Notwendig für die Eignung einer chemischen Substanz als Precursor zur plasmatechnischen Oberflächenbeschichtung ist das Vorhandensein kettenbildender Moleküle. Als Beispiele wurden schon Schwefel, Kohlenstoff und Silizium genannt.

Es folgt eine Tabelle, in der einige Precursor aufgeführt sind. Sie werden unterschieden nach plasmatechnischer Polymerisierbarkeit, Oberflächenhaftung auf amorphem Siliziumcarbid und ihrer Eignung zur Kopplung mit Polysacchariden. Vorzugsweise wurde die Kopplung mit Hyaluronsäure untersucht.

Tabelle 4-4: Untersuchungen von Precursoren zur Oberflächenfunktionalisierung

<i>Verwendeter Precursor</i>	<i>Polymerisierbarkeit</i>	<i>Oberflächenhaftung*</i>	<i>Kontaktwinkel**</i>	<i>Kopplungspotential</i>
Acetaldehyd	gut	schlecht	37 °	unzureichend
Allylalkohol	sehr gut	gut	29 °	gering
Amylalkohol	gut	schlecht	40 °	unzureichend
Allylamin	sehr gut	schlecht	21 °	nicht vorhanden
Aceton	gering	Gut	nicht bestimmt	-
Acetessigsäure-ethylester	gut und leicht hydrophilisierbar	Gut	< 12 °	gering
Ethanol	schlecht	-	-	-
Methanol	nicht möglich	-	-	-
Vanillin	geringe Schichten (Feststoff bei RT)	-	-	-
Acrylsäure	sehr gut	Sehr gut	< 12 °	gering

* Die Haftungeigenschaften wurden mit dem im experimentellen Teil beschriebenen Wischtest ermittelt

** Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf der Oberfläche

Mit Hilfe dieser Technik lässt sich die Grenzflächenenergie zielgerichtet einstellen, je nach gewünschter Anwendung lassen sich extrem hydrophile oder auch hydrophobe Oberflächen erzeugen.

Die Angaben zur Polymerisierbarkeit sind in der Tabelle nur halbqualitativ angegeben. Die Polymerisierbarkeit der unterschiedlichen Precursor wurde bestimmt, indem bei einem Druck von 0,3 mbar und einer Leistung von 60 W, über eine Dauer von 60 Min. gearbeitet wurde. Je nach Precursor wurden so unterschiedliche Schichtdicken mit Hilfe der zyklischen Ellipsometrie gemessen. Die

Schichten waren unterschiedlich gut haftend. Neben den unterschiedlichen Grenzflächenenergien waren die abgeschiedenen, funktionellen Gruppen unterschiedlich gut geeignet, um Polysaccharide, insbesondere die Hyaluronsäure, zu binden. Die Aufschlüsselung der unterschiedlichen Bewertungen zur Polymerisierbarkeit sind in der folgenden Tabelle gegeben.

Tabelle 4-5: Schlüssel zur Bewertung der Polymerisierbarkeit

<i>Plasmapolymerisierbarkeit</i>	<i>Schichtdicke [nm]</i>
sehr gut	150 – 200
Gut	80 – 150
gering	30 – 80
schlecht	5 – 80
nicht polymerisierbar	bis 2

Bei den zur Analyse verwendeten Silizium-Flachsubstraten betrugen die oberflächenbedingten Unterschiede 2 nm. Diese Schichtdickenunterschiede wurden durch unterschiedlich starke Oxidschichten hervorgerufen. Die Genauigkeit der Messung liegt somit bei $> \pm 2$ nm.

Einige Precursor bilden beim Abscheiden eine hydrophobe Oberfläche aus, diese kann durch geeignete Nachbehandlung nachträglich zu einer hydrophilen Schicht verändert werden. Dazu wird für wenige Minuten ein Sauerstoffplasma gezündet. Der Unterschied ist in den folgenden Abbildungen anhand der Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf der Oberfläche gezeigt.



Abbildung 4-23: Wassertropfen auf einer reinen Acetessigsäureethylesterschicht



Abbildung 4-24: Wassertropfen auf einer nachbehandelten Acetessigsäureethylesterschicht

Das obere Bild zeigt den Kontaktwinkel einer Acetessigsäureethylesterschicht. Der Kontaktwinkel beträgt ca. 60° , und liegt somit im Bereich der unbehandelten SiC-Schicht. Das untere Bild zeigt ebenfalls eine Acetessigsäureethylesterschicht, allerdings wurde die Oberfläche in einem reinen Sauerstoffplasma nachbehandelt. Die Nachbehandlungsdauer betrug 30 Sekunden. Die Schichtdicken wurden vor und nach der Sauerstoffbehandlung durch zyklische Ellipsometrie vermessen.

Die Plasmapolymerschicht bei Verwendung von Acetessigsäureethylester beträgt bei einer Plasmaleistung von 80 W und einer Dauer von 6 Min. 12 bis 20 nm. Nach der Sauerstoffbehandlung zur Hydrophilisierung nimmt die Schicht um 5 bis 7 nm ab, bei einer angelegten Plasmaleistung von 80 W und einer Brenndauer von 30 Sekunden.

Die Beschichtung läßt sich durch das Verfahren der Plasmapolymerisation gut durchführen und vereinfachen. Die durch den Plasmaprozeß abgeschiedenen reaktiven Gruppen stehen hingegen nicht zur Ausbildung von kovalenten Verknüpfungspunkten zur Verfügung. Es konnten unter Verwendung der Plasmatechnik gute Schichten generiert werden, die sich zum Teil aber noch ablösen ließen. Diese Probleme traten vor allem bei dünnen Schichten auf, bei dickeren Schichten wurde die Oberflächenhaftung durch den Formschluß übernommen.

4.7.3.3 Schichtdickenbestimmung des Plasmapolymers

Die unterschiedlichen Precursor eignen sich unterschiedlich gut zur Oberflächenmodifikation, wie aus Tabelle 4-5 zu entnehmen ist. Im folgenden werden die Parameter untersucht, die neben dem Precursor einen Einfluß auf die Schichtdicke des Plasmapolymers haben. Als Precursor wurde Acetaldehyd eingesetzt. Die folgenden Parameter wurden geändert:

- Druck im Rezipienten bei der Beschichtung,
- Abstand der Elektroden,
- Wechsel zwischen aktiver und passiver Elektrode,
- Einfluß eines Isolators als Probenaufnehmer.

Die Schichtdicken wurden mit Hilfe der zyklischen Ellipsometrie an Si-Flachsubstraten gemessen. Dabei wurde der Unterschied des Potentials am Flachsubstrat gegenüber dem eines Koronarstents vernachlässigt, was nur zulässig ist, wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, die Fragestellung auf allgemeine Einflußgrößen gerichtet ist. Generell stehen nur wenige Methoden zur Verfügung, mit denen eine Schichtdickenmessung am Stent theoretisch machbar wäre.

4.8 Untersuchungen am Polymercontainer aus mit Diisocyanat vernetztem Polyethylenglykol

Der folgende, polymere Werkstoff wurde zur Immobilisierung ganzer Zellen entwickelt. Bei den Zellen handelte es sich projektbezogen um Motoneuronen und Schwann'sche Zellen.

Der Polymercontainer wurde separat hergestellt und sterilisiert. Die Zellen wurden in geeigneter Pufferlösung (Ringerlösung) suspendiert und mit Hilfe einer Eppendorfpipette in den sackartigen Container transferiert. Im folgenden werden die rein materialwissenschaftlichen Ergebnisse bei der Untersuchung des Materials aufgezeigt.

Die Eignung des Materials wurde unter dem Gesichtspunkt der Biokompatibilität nur in Voruntersuchungen behandelt. Dabei stellte sich heraus, daß ein Polymergerüst aus mit Isocyanat vernetztem Polyethylenglykol ein gewisses Potential für das tissue-engineering besitzt.

Untersucht wurden das Quellungsverhalten und das E-Modul, sowie die Glasübergangstemperatur (T_g) des vernetzten Polymers. Zusätzlich wurde der Einfluß von Additiven, die die Biokompatibilität verbessern oder erst bewirken können, untersucht.

4.8.1 Ergebnisse der Quellungsversuche

Mit Hilfe des Quellungsverhaltens lassen sich Aussagen über den Zustand des polymeren Netzwerkes treffen. Im theoretischen Teil wurde die Bedeutung bei vernetzten Polymeren schon herausgestellt. Während bei Polymerketten und auch bei verzweigten Polymeren die mittlere Molmasse, mit deren Hilfe sich ein Polymer beschreiben läßt und sich seine Eigenschaften vorhersagen lassen, eine große Bedeutung besitzt, steht diese Größe bei vernetzten Polymeren und Hydrogelen nicht zur Verfügung. Hier kann der ganze Werkstoff als molekulare Einheit betrachtet werden. Die Quellungseigenschaften spiegeln den Vernetzungsgrad und damit die Netzwerkdicke wieder.

In der folgenden Abbildung ist der Einfluß der Vernetzermenge auf das Quellverhalten gezeigt.

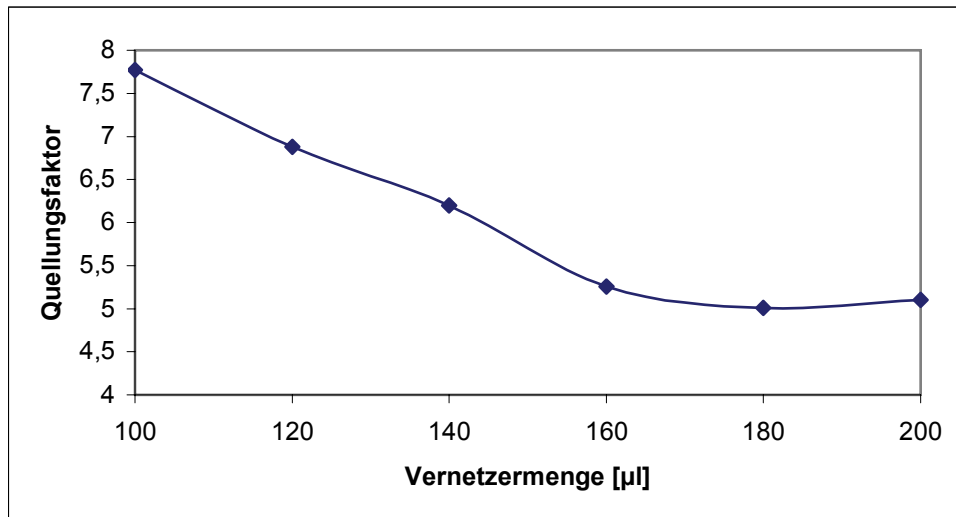


Abbildung 4-25: Einfluß der Vernetzermenge auf das Quellverhalten

Bei steigender Vernetzermenge nimmt der Vernetzungsgrad zu, das Material kann durch Quellung nicht mehr so viel Wasser (Lösungsmittel) aufnehmen. Die steigende Anzahl von kovalenten Verbindungspunkten führt zu mehr Rückstellkräften, die ein Quellen oder Eindringen in die Matrix beschränken. Im Gleichgewicht ist das Wassereindringvermögen in die Matrix so groß wie die Rückstellkräfte, die einem Aufweiten des Materials entgegenwirken.

Im Bereich von 100 bis 160 µl Vernetzermenge pro Standardansatz ist eine lineare Abhängigkeit zu erkennen. Zusätzliche Vernetzermoleküle bzw. direaktive Gruppen finden geeignete, reaktive Gruppen. Die Reaktionen führen zu Verbindungsstellen, die auf das Eindringen von Wasser als Rückstellkräfte wirken. Wird eine kritische Menge überschritten, bewirken zusätzliche Verknüpfungspunkte keine effektiven Bindungen mehr, die einem Aufweiten des Materials, also einer Quellung, entgegenwirken. In der Abbildung erkennt man den Teil am Übergang vom linearen Bereich in den zur X-Achse parallelen Teil. Hier änderte der Vernetzer nicht mehr das molekulare Gefüge. Neue Bindungen entstehen an Stellen, an denen die Polymerketten durch andere Knüpfungspunkte in der Nachbarschaft schon fixiert sind.

4.8.2 Auswertung der E-Module

Wie im experimentellen Teil beschrieben, wurden mit den hergestellten PEG-Schläuchen Dehnversuche durchgeführt und Spannungs-Dehnungs-Diagramme aufgenommen. Aus den Meßdaten wurden die E-Module berechnet. Die Auswirkungen der Vernetzermenge und damit des Vernetzungsgrades auf das E-Modul sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

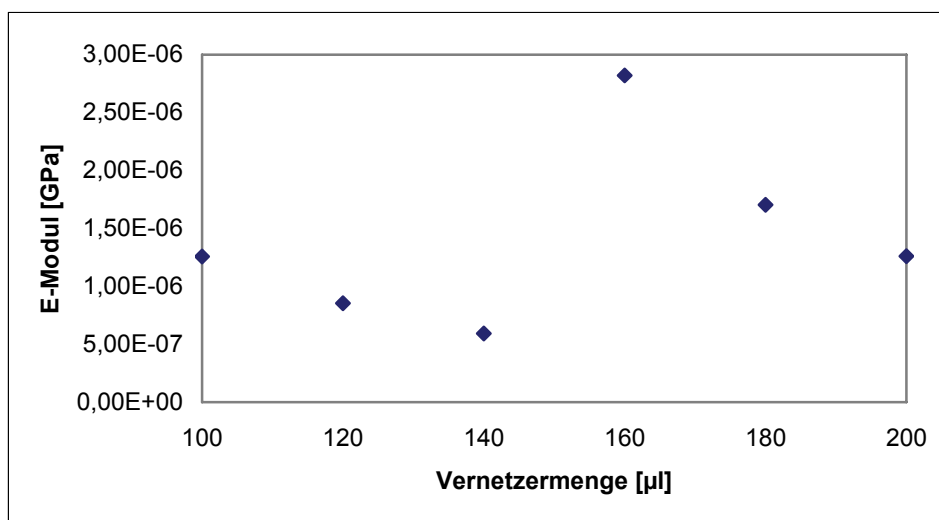


Abbildung 4-26: Einfluß der Vernetzermenge auf das E-Modul

Die Werte sind, wie in der Literatur üblich, in GPa angegeben.

Der E-Modul von mit HMDI vernetzten Polyethylenglykolschläuchen liegt mehrere Größenordnungen unter denen von Substanzen wie Gummi.

Bei Zugabe von 100 bis 140 µl HMDI zur PEG-Schmelze sinkt das E-Modul, ebenso im Bereich der Zugabe von 160 bis 200 µl HMDI. Dieses Ergebnis würde bedeuten, daß das Material bei größerer Vernetzermenge elastischer und in einem größeren Bereich reversibel verformbar wird. Dies wird rein phänomenologisch nicht bei den Proben beobachtet. Bei größeren Vernetzermengen werden die Schläuche zunehmend unelastischer und fester. Im Bereich von 140 µl zu 160 µl ergibt sich ein Wechsel in den plastischen Eigenschaften. Hier führt eine größere Menge zu einer Erhöhung des E-Moduls.

Für standardisierte Messungen ist in einer DIN die Form des Probenkörpers für Messungen des E-Moduls vorgeschrieben. Die Form des standardisierten Probenkörpers dient dazu, den Einfluß der Einspannvorrichtung zu egalisieren, da dieser Probenkörper in der Mitte eine Verdünnung aufweist. Dadurch entsteht in der Mitte der Probe eine Sollbruchstelle, die Messungen werden somit vergleichbar. Bei den bisher ausgewerteten Versuchen lag der Bruch immer an verschiedenen Stellen vor, teilweise in der Mitte der Probe, sehr oft aber auch an der Einspannkante, wodurch ein falsches E-Modul errechnet wird.

Es wurden neue Messungen durchgeführt, bei denen keine Messungen in die Auswertung mit aufgenommen wurden, die an den Spannkanten der Klemmvorrichtung gerissen sind. Lediglich Schläuche, die in der Mitte ohne Einfluß der Spannvorrichtung gerissen sind, wurden ausgewertet. Vermessen wurden zwei PEG-Proben, die einmal mit 100 µl HMDI und beim zweiten Mal mit 200 µl HMDI vernetzt wurden. Zusätzlich wurden ein Alginatschlauch und ein itakonisierter, photovernetzter HA-Schlauch untersucht.

Die errechneten E-Module sind in der folgenden Abbildung gezeigt. Die PEG-Proben wurden mit dem Isocyanat HMDI vernetzt.

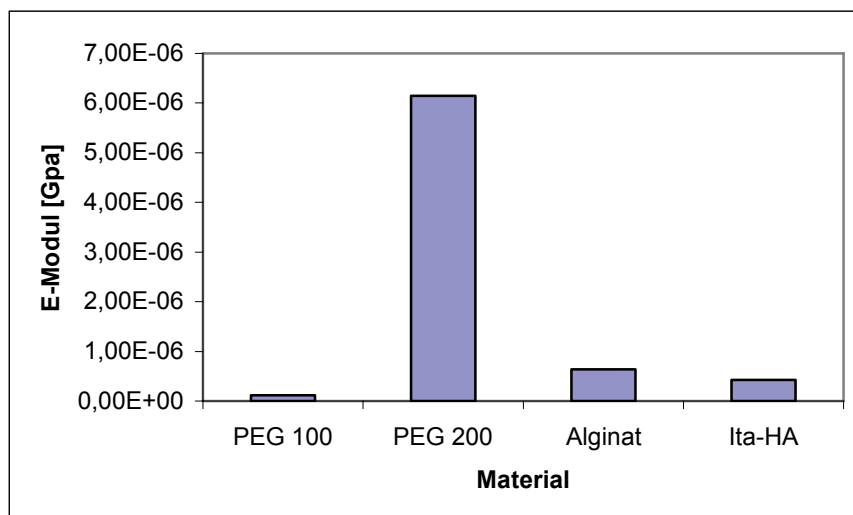


Abbildung 4-27: Errechnete E-Module unterschiedlicher Materialien

Hier stimmen die Ergebnisse mit den subjektiv bewerteten Materialeigenschaften überein. Das stark vernetzte PEG ist um ein Vielfaches unelastischer und nur in

einem kleinen Bereich reversibel verformbar. Das leicht vernetzte PEG läßt sich in einem großen Bereich sehr leicht verformen. Alginat ist flexibler als PEG 200 und itakonisierte, photovernetzte Hyaluronsäure, aber nicht so leicht deformierbar wie PEG 100. Alginat und die Ita-HA-Probe haben, bezogen auf ihr elastisches Verhalten, annähernd gleiche Eigenschaften.

Auch die folgenden Versuche sind unter dem Gesichtspunkt, keine Versuche mit einem Riß an einer Spannkante mit einzubeziehen, in die Auswertung aufgenommen worden. Wieder wurde die Anlage, wie im experimentellen Teil beschrieben, kalibriert. Der Unterschied zu vorherigen Messungen liegt hier in einer neu eingebauten Kraftmeßdose. Vermessen wurden PEG-Proben, bei denen neben dem Standardansatz native und mit Epichlorhydrin vernetzte HA zugesetzt wurden. Zusätzlich wurde eine PEG-Probe vermessen, die mit Epichlorhydrin vernetzte Hyaluronsäure als Additiv besitzt und mit 100 Gy beta-Strahlung sterilisiert wurde.

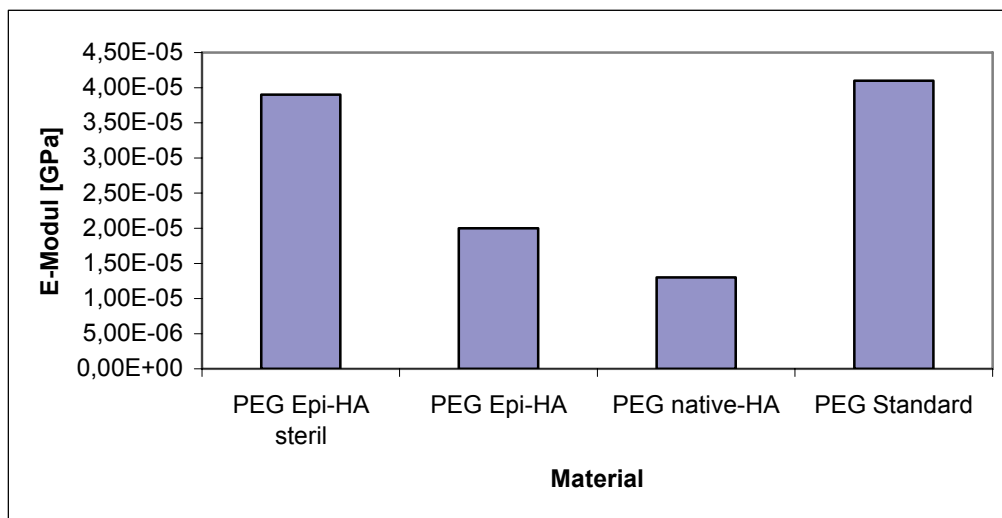


Abbildung 4-28: Einfluß von unterschiedlichen Additiven auf das E-Modul

Aus der Abbildung ist zu erkennen, daß auch die Sterilisierung von nur 100 Gy einen Einfluß auf das E-Modul besitzt. Das Material wird unflexibler. Durch den Zusatz von Additiven werden die plastischen Eigenschaften allgemein verbessert, wobei der Einbau nativer HA, die nach der Schlauchherstellung durch Dialyse entfernt wird, einen größeren Einfluß hat als die unlösliche, mit Epichlorhydrin vernetzte HA.

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß der Schlauch als Probenkörper wenig geeignet ist, um E-Module zu bestimmen. Die Schläuche wiesen keine einheitlichen Wandstärken auf, wodurch der Reißpunkt einer Probe früher erreicht wird, als bei Proben mit einheitlicher Wandstärke (schwächstes Glied einer Kette). Die Rasterelektronenmikroskopieaufnahme einer Probe, deren Auswertung im Abschnitt 4.8.5 stattfindet, veranschaulicht noch einmal die stark unterschiedlichen Wanddicken der Schläuche (vgl. Abbildung 4-40).

4.8.3 Auswertung der Glasübergangstemperatur

Die Glasübergangstemperatur (T_g) stellt eine sinnvolle Größe dar, um Materialien und Materialeigenschaften bei unterschiedlichen Temperaturen zu untersuchen. Um das System PEG/HMDI weiter und besser zu charakterisieren, wurden an den unterschiedlichen Vernetzungsgraden und auch an den PEG-Proben mit Additivzusatz T_g -Messungen durchgeführt. Eine solche Messung ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

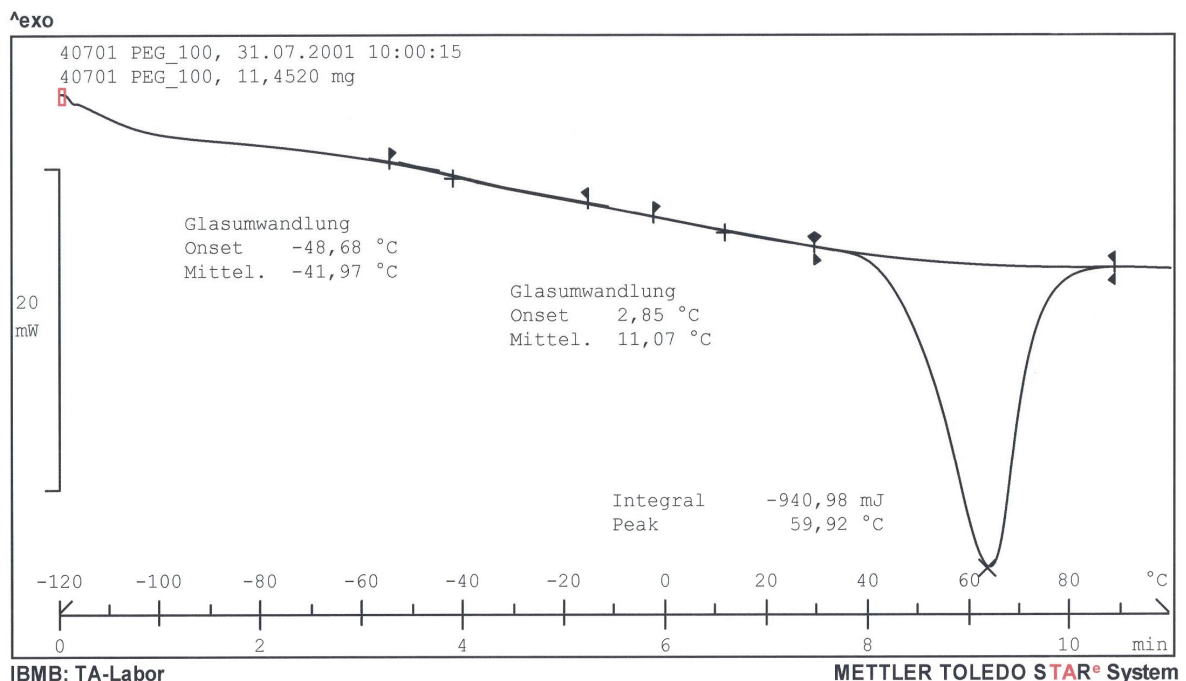


Abbildung 4-29: Ermittlung der Glasübergangstemperatur von mit 100 µl HMDI versetztem PEG

Die Glasübergänge sind, wie auch bei allen weiteren Messungen, nur schwach zu erkennen. Der Schmelzpeak ist deutlich bei 60 °C zu erkennen und kann integral ausgewertet werden. Der Schmelzpunkt ist ebenfalls eine materialabhängige Größe und beträgt für das mit HMDI vernetzte Polyethylenglykol 60 °C. Es wird bei -42 °C und bei 11 °C eine Glasübergangstemperatur beobachtet.

Das Auftreten von zwei Glasübergangstemperaturen ist für diese Polymerwerkstoffe nicht ungewöhnlich. Das Material lässt sich in ein Weich- und ein Hartsegment unterteilen. Dieses Verhalten ist auch bei anderen Polymeren zu beobachten, bei denen größere Präpolymere mit kleineren Crosslinkern wie dem HMDI vernetzt werden. In der Literatur wird der Glasübergangszustand für reines, unvernetztes Polyethylenglykol mit -45 °C angegeben.

Die folgende Abbildung zeigt eine weitere Messung zur Bestimmung der T_g , diesmal mit höher vernetztem PEG.

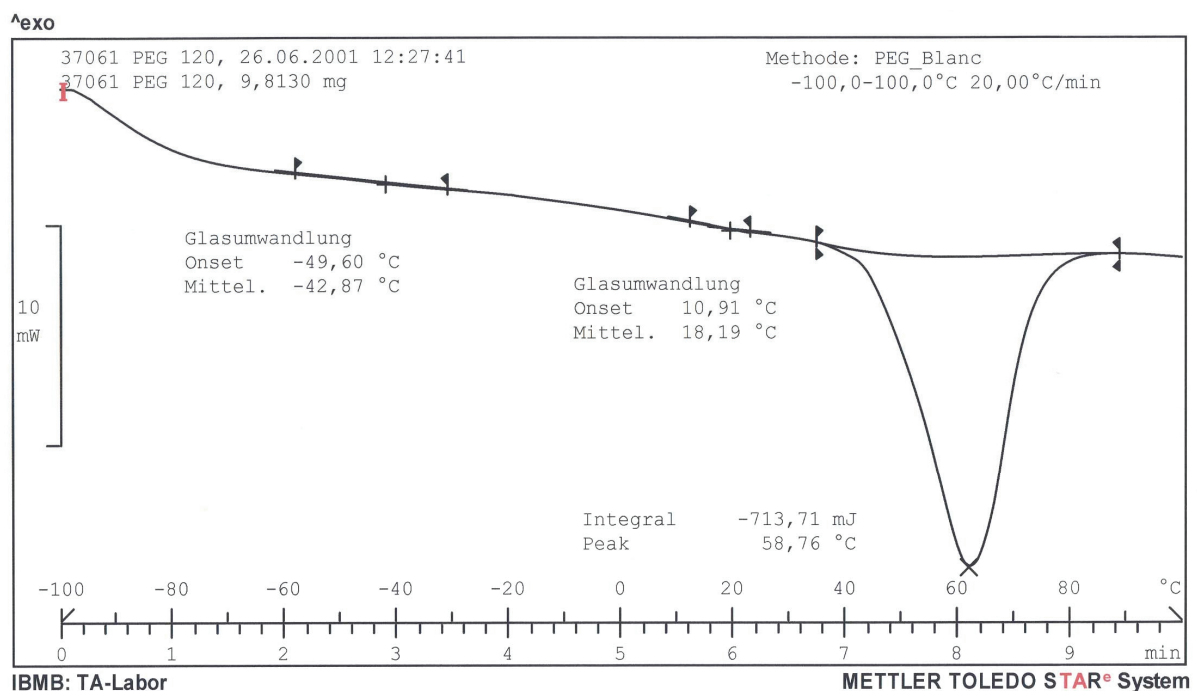


Abbildung 4-30: Ermittlung der Glasübergangstemperatur von mit 120 µl HMDI versetztem PEG

Zur besseren Visualisierung der Glasübergangstemperatur wurden verschiedene Aufheizraten verwendet, wobei sich 2 K/Min. als sinnvoll erwiesen haben. Zusätzlich wurde mit dem verwendeten Tiegel vorher eine Kalibrierkurve aufgenommen, die

dann von der eigentlichen Messung abgezogen wurde. Der Schmelzpunkt dieser Probe beträgt 59 °C. Die erste Glasübergangstemperatur für das Weichsegment beträgt -43 °C, für das Hartsegment liegt die Glasübergangstemperatur bei 18 °C.

Eine weitere T_g -Messung ist im folgenden gezeigt. Hier wurde, wie schon bei den obigen Messungen, die Vernetzermenge an HMDI weiter erhöht und beträgt jetzt 180 µl pro 1 g PEG-Schmelze.

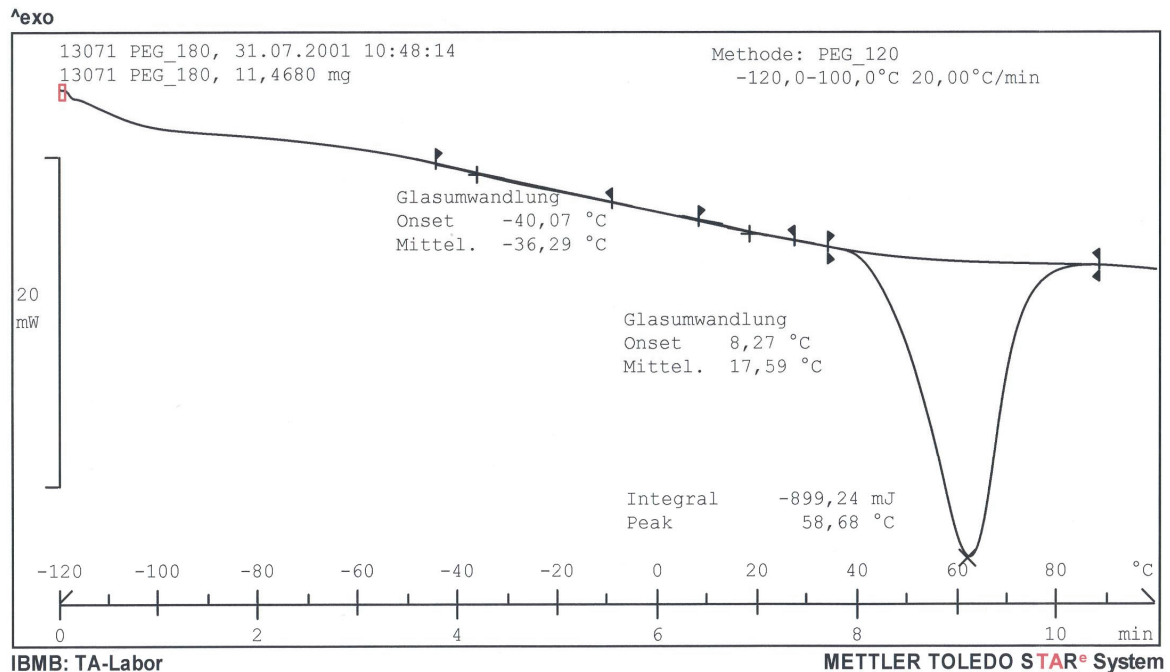


Abbildung 4-31: Ermittlung der Glasübergangstemperatur von mit 180 µl HMDI versetztem PEG

Der Schmelzpunkt dieser Probe beträgt 59 °C. Die erste Glasübergangstemperatur beträgt -36 °C, die zweite 18 °C. Bei einer Veränderung des Bildausschnitts sind die für die Glasübergänge und entsprechende Phasenübergänge zweiter Ordnung typischen Stufen besser zu erkennen.

Die folgende Abbildung zeigt das mit der maximalen Menge HMDI vernetzte Polyethylenglykol. Eine höhere Vernetzermenge als 200 µl auf 1 g PEG-Schmelze führt zu unelastischen, brüchigen Polymercontainern.

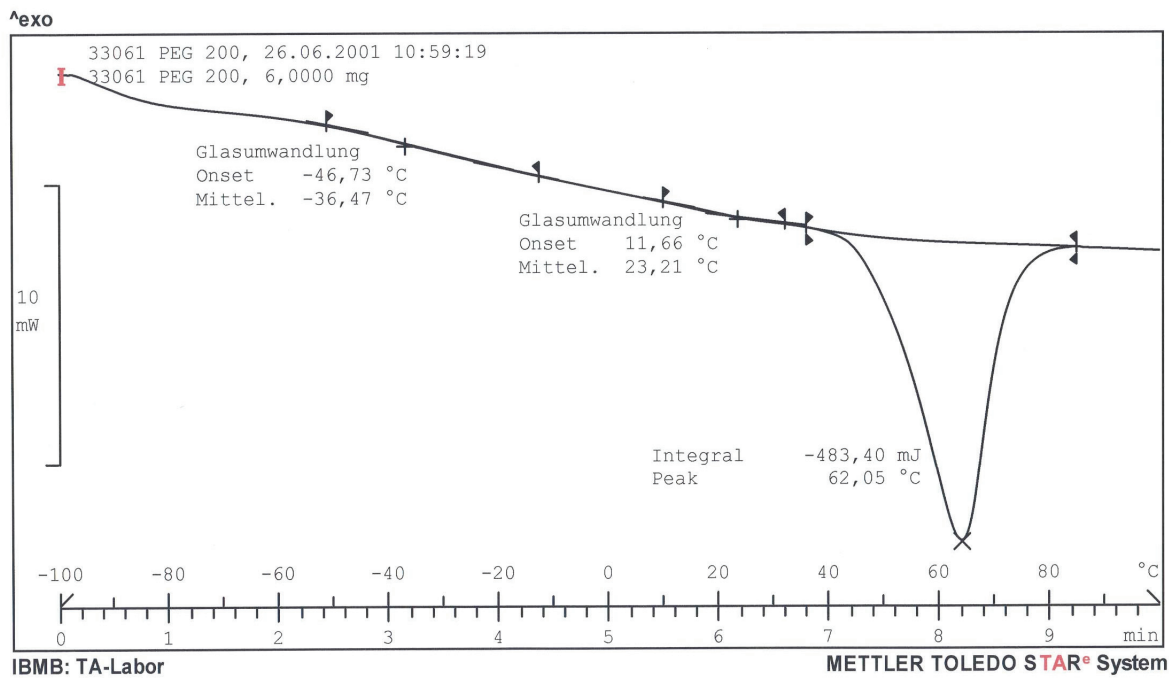


Abbildung 4-32: Ermittlung der Glasübergangstemperatur von mit 200 µl HMDI versetztem PEG

Der Schmelzpunkt beträgt hier 62 °C. Die Glasübergangstemperatur für das Weichsegment ist bei -36 °C, die für das Hartsegment bei 23 °C zu finden.

Eine vergleichende Gegenüberstellung der einzelnen Glasübergangstemperaturen ist in der folgenden Tabelle gegeben.

Tabelle 4-6: Vergleichende Gegenüberstellung der Glasübergangs- (T_g) und der Schmelztemperaturen

Vernetzermengen [µl pro 1 g PEG- Schmelze]	Erste T_g (Weichsegment) [°C]	Zweite T_g (Hartsegment) [°C]	Schmelzpunkt [°C]
100	-42	11	60
120	-43	18	59
180	-36	18	59
200	-36	23	62

Bei Veränderung der Vernetzermenge ändert sich der Schmelzpunkt des Materials scheinbar nicht. Eine integrale Auswertung der Peaks unter Berücksichtigung der Schmelzwärme von PEG und der eingewogenen Menge des Polymers wurde vorgenommen, jedoch reicht bei dem verwendeten Gerät die Empfindlichkeit des Sensors nicht aus. Allerdings war neben vielen Meßfehlern die Tendenz erkennbar, nach der die Schmelzwärme mit steigender Vernetzermenge steigt.

Die Veränderung der Glasübergangstemperaturen ist in der folgenden Abbildung noch einmal wiedergegeben.

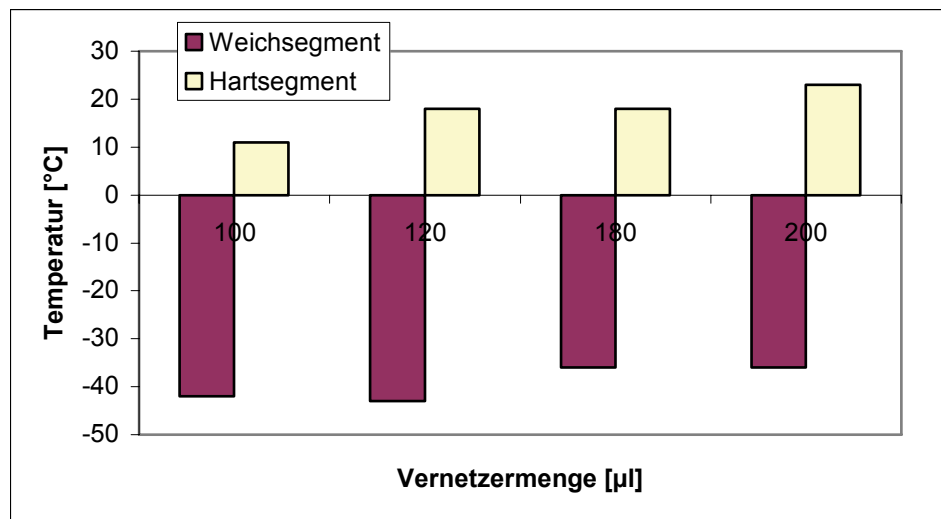


Tabelle 4-7: Gegenüberstellung der gefundenen Glasübergangstemperaturen

Die Phasenumwandlungstemperatur für das Weichsegment sinkt etwas, die für das Hartsegment steigt an.

Zusammenfassend läßt sich aus den gefundenen Werten schließen, daß mit steigender Vernetzermenge die Weichsegmente abnehmen und kleiner werden, die Bereiche im Polymer, die aus Hartsegmenten bestehen, nehmen zu.

4.8.4 Einfluß von Additiven auf die Materialeigenschaften von mit HMDI vernetztem Polyethylenglykol

Die Poren in einem Polymer sind gerade bei der medizinischen Applikation als drug-release-System von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurde der Einfluß von Additiven auf die Morphologie der polymeren Matrix untersucht.

Bei der Auswahl der Additive wurde insbesondere darauf geachtet, daß die Zusätze die Biokompatibilität verbessern und / oder eine pharmakologische Eigenwirkung mitbringen, wie im Fall der Hyaluronsäure.

Der Einfluß der Additive wurde am mit Isocyanat vernetztem Polyethylenglykol untersucht. Dabei wurde getestet, inwieweit die Additive die Materialeigenschaften verändern.

4.8.4.1 Vorgehensweise beim Einbau der Additive in die PEG-Matrix

PEG wird geschmolzen und anschließend mit der geeigneten Menge Quervernetzer versetzt. Aus diesen Schmelzen kann das Produkt erhalten werden. Vor der Formgebung ist es möglich, Additive in die Schmelze zu geben. Die Wahl der verwendeten Additive richtet sich nach den Anforderungen, die an das Material gestellt werden. Der Zweck der Additive ist neben der besseren Biokompatibilität die Einstellung der Diffusionseigenschaften, die durch geschickte Wahl der Zusätze maßgeschneidert eingestellt werden können.

Zu diesem Zweck wurden Zusätze in die Polymermatrix eingebaut, die dann in den folgenden Spülschritten wieder entfernt wurden. An der Stelle, an der der Zusatz in der Matrix fixiert war, verbleibt nun ein Loch, das die Diffusionseigenschaften des Zellcontainers bestimmt.

Es hat sich gezeigt, daß die verwendete Matrix unanfällig gegenüber Variationen ist. Die mechanischen und makroskopischen Eigenschaften des Materials ändern sich nur in kleinen Bereichen.

Alternativ kann auch das Hülse-Kern-Verfahren angewendet werden, allerdings führt dieses Verfahren zu Schläuchen mit stark unterschiedlichen Wandstärken und damit zu ungleichmäßigen Diffusionseigenschaften.

4.8.5 Ergebnisse der Thermoporosimetrie

Die Ergebnisse zeigen eine Tendenz, die absoluten Werte dürfen bei dem verwendeten Meßgerät nicht überbewertet werden. Bei der Messung der Porengrößenverteilung mittels Thermoporosimetrie stellt sich ein generelles Problem.

Die Probe wird eingewogen und mit bidestilliertem Wasser versetzt. Die Menge an Wasser muß so bemessen sein, daß das Polymer quillt und entsprechend die Poren mit Wasser gefüllt sind. Zusätzlich muß ein Rest an Wasser vorhanden sein, der als Bulkwasser bezeichnet wird und keiner Schmelzpunktdepression unterliegt. Der Schmelzpeak des Bulkwassers liegt bei 0 °C und dient als interner Standard der Kalibrierung. Es hat sich gezeigt, daß das Bulkwasser vorhanden sein muß, allerdings muß die Menge dabei auf ein gewisses Maß reduziert werden. Wenn sich zuviel Wasser in dem Proben Tiegel befindet, sammelt es sich am Tiegelboden und verhindert so den Wärmestrom zum Meßsensor, der sich ebenfalls am Boden befindet. Bei einer Temperaturführung, bei der mit 0,5 °C pro Minute der Tiegel geheizt wird, schmilzt zuerst das porenggebundene Wasser und erst danach das Bulkwasser. Bei einer zu großen Menge des Bulkwassers wirkt dieses als Isolator.

Der reversible Schritt als Eintemperaturprogramm, bei dem der Tiegel nicht aufgeheizt, sondern schrittweise abgekühlt wird, ist nicht möglich. Bei Wasser beobachtet man das Phänomen der kinetischen Hemmung zur Eisbildung (Kristallbindung). Es können metastabile Zustände auftreten, bei denen das Wasser in unterkühlter Form vorliegt. Deshalb wurde das Experiment auch so durchgeführt, daß bei einer Temperatur von -25 °C als Startpunkt begonnen wurde. Hier ist damit zu rechnen, daß das Wasser in fester Form vorliegt.

Die folgende Abbildung zeigt die ersten Ansätze, um durch thermische Analyse die Porengröße zu ermitteln.

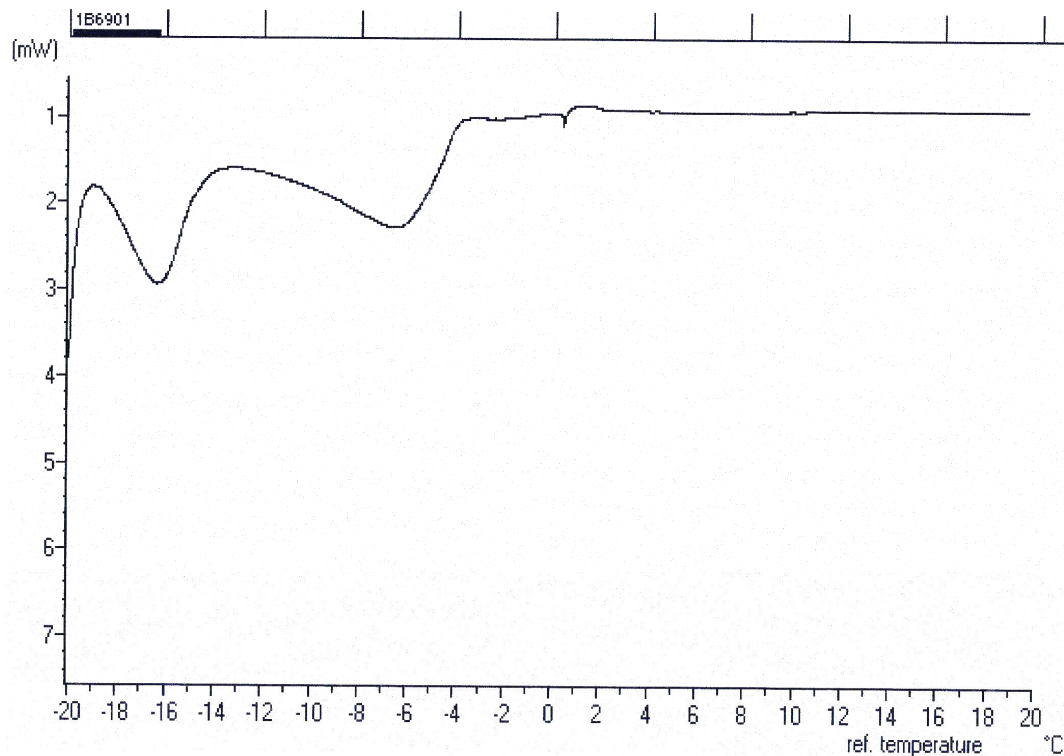


Abbildung 4-33: Erste Untersuchung der Porengrößenverteilung durch Termoporosimetrie

Die Ausbildung der Peaks ist noch sehr unscharf. Durch größere Polymermengen bei der Analyse wird versucht, stärkere Signale zu erreichen. Wie oben beschrieben, muß für jede Polymermenge und jede Vernetzungsart die nötige Wassermenge ermittelt werden.

Die Polymerprobe muß ausreichend aufgearbeitet werden. Befinden sich z.B. Salze im Polymer, wie das Natriumcyanoborhydrid, das bei der Vernetzung mit Glutaraldehyd zum Einsatz kommt, können diese auch zu einer Schmelzpunktdepression führen. Lösliche Substanzen, die aus dem Polymer ausgewaschen werden, können die Messung verfälschen. Deshalb werden alle Proben vor der thermischen Analyse ausreichend dialysiert. Das Dialysewasser darf nach der Gefriertrocknung keine Rückstände zeigen. Das Schmelzverhalten der Waschlösungen wird analysiert. Die Schmelzpunktdepression, hervorgerufen durch gelöste Stoffe, stellt einen Entropieeffekt dar und kann von der eigentlichen Messung nicht getrennt werden.

Die folgende Abbildung zeigt typische Thermogramme zur Bestimmung der Schmelzpunktdegradation an vernetztem Polyethylenglykol.

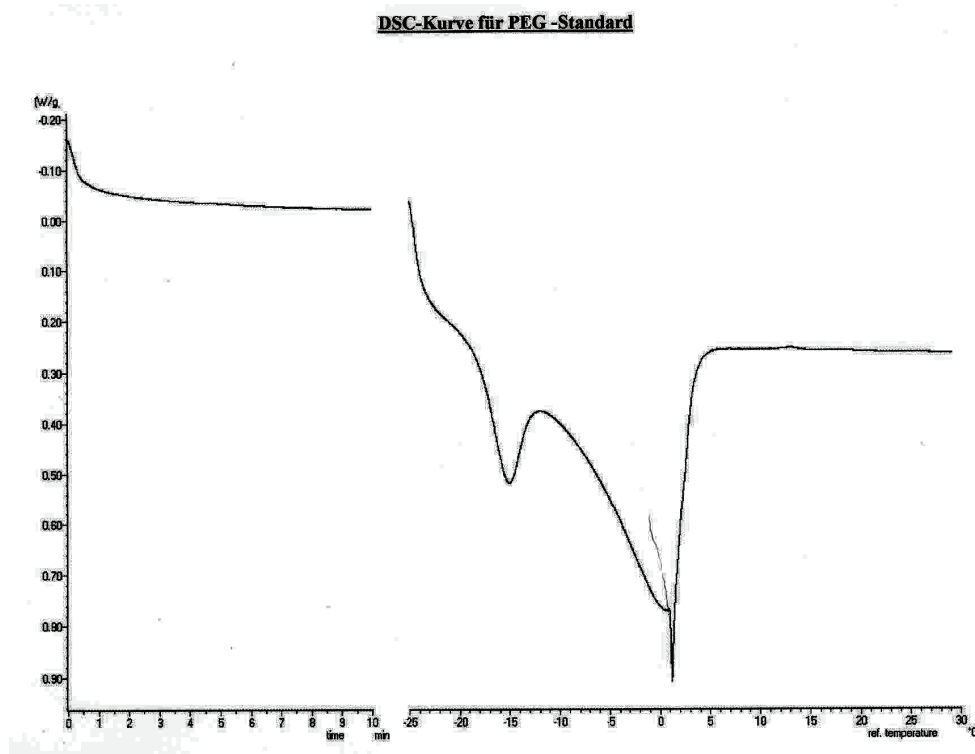


Abbildung 4-34: Thermogramm der Schmelzpunktdegradation von porengelassenem Wasser

Der deutlichste Peak ist bei ca. 0 °C zu erkennen. Hier handelt es sich um den Schmelzpeak des Bulkwassers. Der Peak ist schmal und wird von einer breiteren Kurve überlagert. Hierbei handelt es sich um Wasser, das in verhältnismäßig großen Poren eingeschlossen ist. Bei ca. -15 °C ist ein kleiner Peak zu erkennen. Hierbei handelt es sich um Wasser, das in sehr viel kleineren Poren gebunden ist.

Diese Messungen wurden aufgenommen und ausgewertet, nachdem die Meßparameter ermittelt waren und die Messungen in sich stimmig, also reproduzierbar, waren. Bei der Probe handelt es sich um den Standardansatz einer mit Diisocyanat vernetzten Polyethylenglykolmatrix. Der Ansatz wurde gewählt, weil durch diesen Ansatz alle an den Werkstoff gestellten Anforderungen erfüllt wurden. Der nach dem Standardansatz hergestellte Werkstoff war mechanisch stabil, ausreichend flexibel und gut „vernähbar“.

Die Auswertung der Abbildung deckt sich mit den Erkenntnissen, die aus Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen gewonnen wurden, wo große Poren deutlich zu erkennen waren und sehr viel kleinere Poren, die erst bei stärkerer Vergrößerung sichtbar wurden.

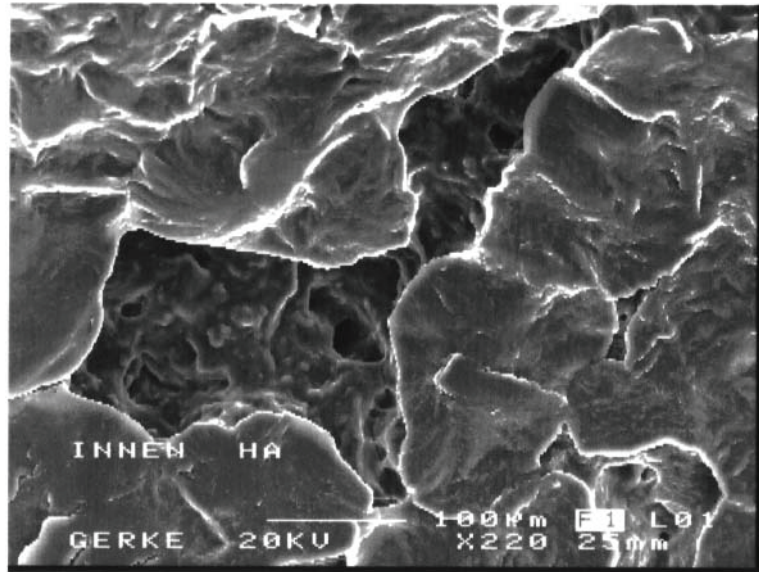


Abbildung 4-35: REM-Aufnahme einer Pore aus einer PEG-Probe

Für REM-Aufnahmen muß die Probe im getrockneten Zustand vorliegen. Der Maßstab ist als weißer Balken (100 µm) im Foto dargestellt.

Der beschriebene Standardansatz wird auf die Möglichkeit des Additivzusatzes getestet. Der Einfluß auf die Poren wird über Thermoporosimetrie bestimmt. Bei den Additiven handelt es sich um wasserlösliche und wasserunlösliche Substanzen. Im Fall der wasserlöslichen Stoffe muß sichergestellt sein, daß sie aus der Polymermatrix zu Beginn der Messung entfernt sind, da gelöste Stoffe, wie oben beschrieben, zu einer Schmelzpunktdepression führen.

Eine weitere Optimierung stellt eine Aufheizrampe dar. Durch eine Vorabmessung wurde ermittelt, bei welcher Temperatur ein Wärmestrom auftritt. Bei weiteren Messungen wurde mit einer sehr viel kleineren Aufheizrate gearbeitet, die von isothermen Stufen unterbrochen wurde. Damit wurde der Tatsache Rechnung getragen, daß das System sehr träge ist. In der obigen Abbildung ist zu sehen, daß die X-Achse unterbrochen ist. Hier wurde vor dem erwarteten Wärmestrom für einige Zeit die Temperatur gehalten.

Im folgenden ist ein Thermogramm gezeigt, bei dem mit Epichlorhydrin vernetzte HA in die PEG-Matrix eingebracht wurde.

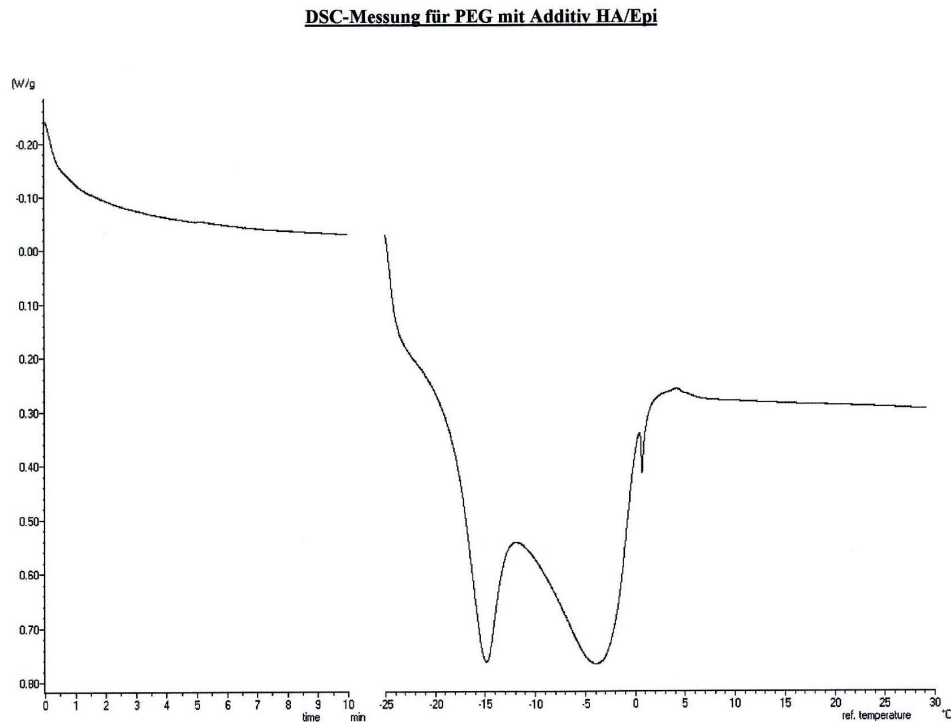


Abbildung 4-36: Porengrößenverteilung von mit Additiven versetztem, vernetztem PEG

Auch bei dieser Probe sind zwei unterschiedliche Peaks zu sehen, die für zwei stark unterschiedlich große Porenarten stehen. Der Schmelzpeak des Bulkwassers ist scharf, aber nicht sehr intensiv. Wieder trat das Problem auf, möglichst viel Polymermasse in den Tiegel zu geben und eine ausreichende, aber nicht zu große Menge Wasser. Wie schon oben beschrieben, wurde vor Auftreten des Wärmestroms, ausgelöst durch die Schmelzpunktdepression, eine isotherme Stufe eingebaut.

Für diese Probe wurden auch REM-Aufnahmen angefertigt, die im folgenden zu sehen sind. Dazu wurde ein Schnitt durch das Material gelegt. Der Schnitt wurde dann mit Gold bedampft. Wieder ist nur der Zustand des trockenen Materials zu sehen.

Als Modellsubstanz der „unlöslichen Additive“ wurde die mit Epichlorhydrin vernetzte Hyaluronsäure benutzt. Das Material kann, wie im experimentellen Teil beschrieben, nach der Dialyse gefriergetrocknet werden und fällt dann als pulverförmiger, unlöslicher Feststoff an.

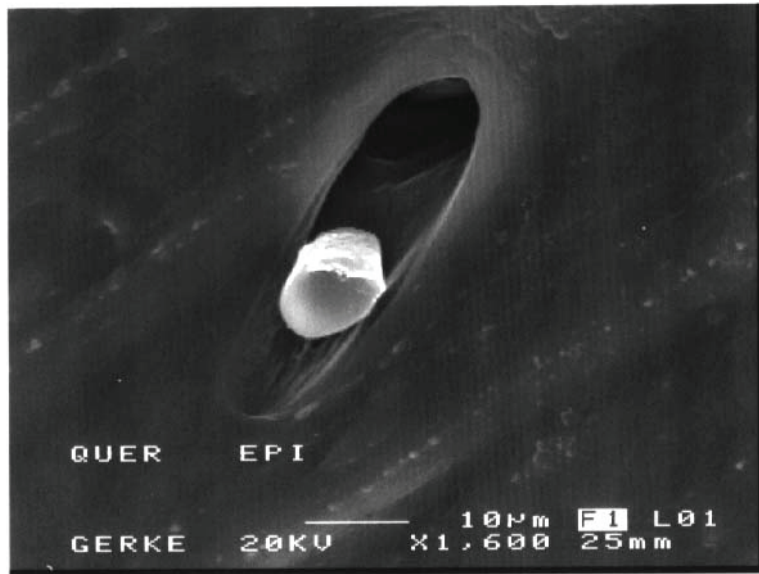


Abbildung 4-37: REM-Aufnahme der Einlagerung eines unlöslichen Additivs in die PEG-Matrix

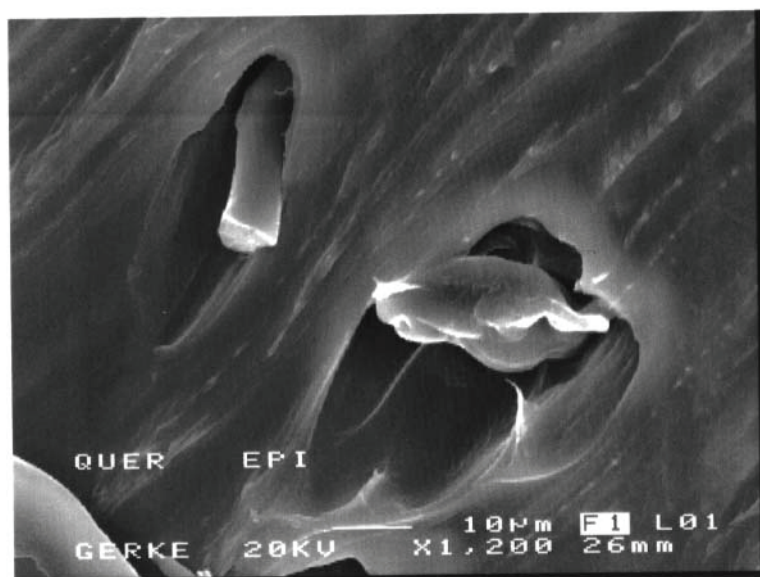
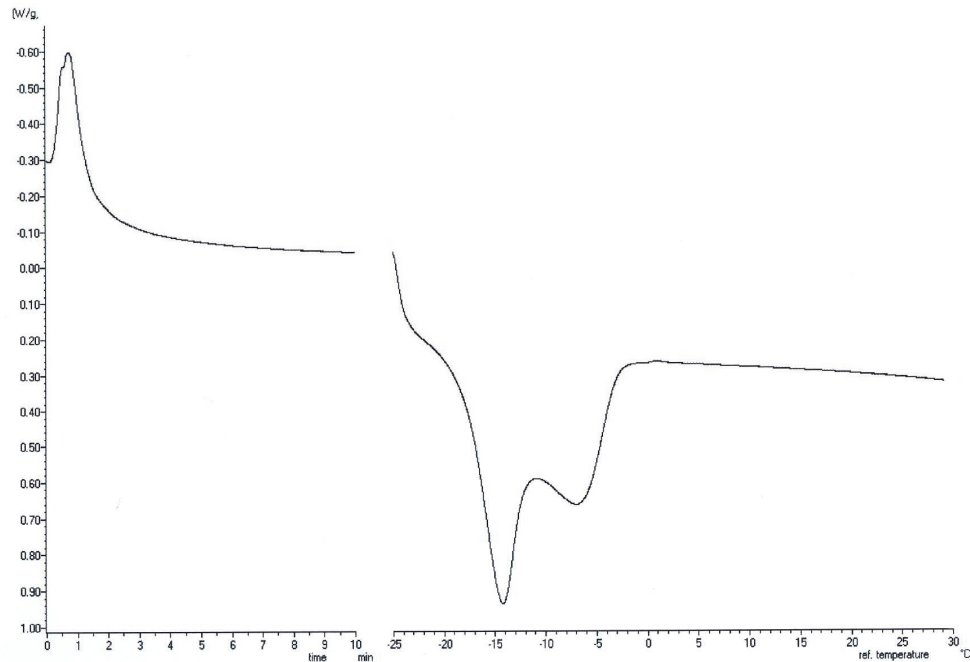


Abbildung 4-38: REM-Aufnahme einer Anhäufung von unlöslichen Additiven in der PEG-Matrix

Deutlich sieht man, daß Fragmente der unlöslichen Additive in der Matrix zurückbleiben. Im Randbereich ist das gerade bei medizinischer Applikation als besonders kritisch anzusehen, da diese lockeren Teile sich lösen und in die Blutbahn gelangen können.

Im folgenden wurden lösliche Additive, wie die unvernetzte Hyaluronsäure, in die PEG-Matrix eingebaut.

DSC-Messung für PEG mit Additiv Na/HA**Abbildung 4-39: Auswirkung des Einbaus von nativer HA auf die Porengrößenverteilung**

Hier ist ein Beispiel für ein Thermogramm gezeigt, bei dem das gesamte zugesetzte Wasser in das Polymer durch Quellung aufgenommen wurde. Es ist kein Peak für die Schmelzwärme des Bulkwassers zu erkennen. Aus vorangegangenen Kurven kann abgeleitet werden, daß das Bulkwasser bei $0\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ schmilzt. Die Ungenauigkeit liegt zum einen an der Empfindlichkeit des Sensors der DSC-Meßzelle, zum anderen an der Kalibrierung des Gerätes.

Für diese Probe wurde ebenfalls ein REM-Bild aufgenommen.

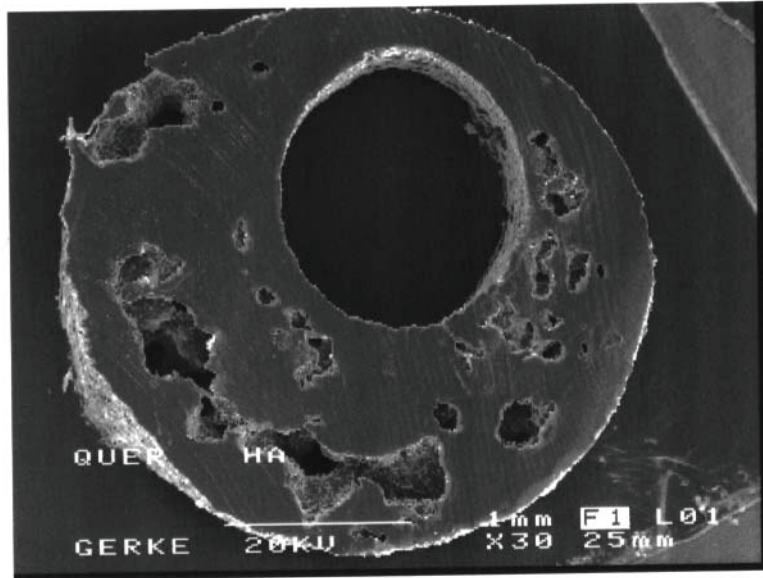


Abbildung 4-40: REM-Aufnahme einer PEG-Matrix nach dem Ausspülen der nativen HA

Die Hyaluronsäure wurde gemörstert und in die PEG-Schmelze eingerührt. Bei der Verarbeitung wurde schon beobachtet, daß sich keine gleichmäßige Verteilung des Materials erreichen läßt. Das ist auch in der REM-Aufnahme zu sehen.

Die Porengrößen errechnen sich, wie im theoretischen Teil beschrieben, nach der Gibbs-Thomson-Gleichung. Dabei ist zu beachten, daß die Porengrößen und ihre Verteilung nur relativ zueinander betrachtet werden können. Für eine Absolutbestimmung muß die Oberflächen- (Interface-) Energie Wasser/Polymer bekannt sein. Ein Mittel, um die Grenzflächenenergie zu bestimmen, ist die Ermittlung des Kontaktwinkels vom Wasser zum vernetzten Polymer. Wenn der Kontaktwinkel bekannt ist, im vorliegenden Fall der Benetzung von mit HMDI vernetztem PEG mit Wasser beträgt der Kontaktwinkel 27° , kann aus diesen Daten und dem Abgleich mit einem Material mit bekannten Porengrößen der tatsächliche Wert ermittelt werden. Dabei wird die Gibbs-Thomson-Gleichung um einen Korrekturfaktor (σ_{ls} , Oberflächenenergie zwischen der flüssigen und festen Phase, vgl. theoretischer Teil) erweitert.

Als Vergleichssubstanz mit bekannten Porengrößen wurde Molsieb (4\AA) herangezogen. Damit wurde σ_{ls} ermittelt und beträgt demnach $12,1\text{ mN/m}$. Die Grenzflächenenergie wurde durch eine Probemessung ermittelt, als Porendurchmesser wurden die 4 \AA eingesetzt und nach σ_{ls} aufgelöst.

Molsieb stellt kein optimales System dar, um das vorliegende Problem zu simulieren, die Oberflächenenergien von Molsieb und von mit HMDI vernetztem PEG mit Wasser liegen aber in der gleichen Größenordnung. Da der Fehler, der durch ein anderes σ_{ls} entsteht, für alle Werte der gleiche ist, ist ein Vergleich der Werte untereinander also zulässig.

In der folgenden Tabelle sind die zu den gemessenen Schmelzpunktdepressionen ermittelten Porengrößen aufgeführt.

Tabelle 4-8: Porengrößen und die zur Ermittlung gemessenen Schmelzpunktdepressionen

$\Delta T [^{\circ}C]$	Porengröße [nm]
15	2,7
5	8,1
2	20,2

Die Werte beziehen sich auf die mit dem System „Molsieb“ ermittelten Grenzflächenenergien.

4.8.5.1 Ermittlung der Oberflächenenergien von durch Plasmabehandlung und durch naßchemische Verfahren geätzten Substraten

Die Kontaktwinkelmessung wurde jeweils mit Wasser, Glycerin und Ethylenglykol durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt die Resultate für verschiedene Proben:

Tabelle 4-9: Kontaktwinkel unterschiedlicher Lösungen an Oberflächen

<i>Verwendete Substrate</i>	Θ_{Wasser}	$\Theta_{\text{Ethylenglykol}}$	Θ_{Glycerin}
Siluzium, unbehandelt	50,7	25,6	44,1
Silizium, O ₂ -Plasma (30 Min., 200 W, passive Seite)	18,2	28,8	32,6
Silizium, O ₂ -Plasma mit Teflon (15 Min., 200 W, aktive Seite)	21,1	13,4	22,7
Silizium, Ar-Plasma mit Teflon (90 Min., 200 W, passive Seite)	32,6	39,1	28,8

Für die Oberflächenspannungen ergaben sich nach der OWRK-Methode folgende Werte:

Tabelle 4-10: Nach OWRK Methode berechnete Oberflächenspannungen

<i>Verwendete Substrate</i>	σ_{W+Gly}	σ_{W+Eth}	$\sigma_{Gly+Eth}$
Siluzium, unbehandelt	48,7	48,6	60,3
Silizium, O ₂ -Plasma (30 Min., 200 W, passive Seite)	78,4	90,7	187,7
Silizium, O ₂ -Plasma mit Teflon (15 Min., 200 W, aktive Seite)	69,9	79,0	188,0
Silizium, Ar-Plasma mit Teflon (90 Min., 200 W, passive Seite)	62,1	80,6	384,1

Die mit Wasser und Ethylenglykol bzw. Glycerin als Testflüssigkeiten berechneten Oberflächenspannungen lagen alle in derselben Größenordnung. Die typischen Werte für Metalle liegen laut Fachliteratur bei $\sigma > 500 \text{ mN/m}$, für Polymere bei $\sigma = 10\text{--}40 \text{ mN/m}$. Die Oberflächenenergie für das Modellsystem „Molsieb 3 Å“

betrug 12 mN/m. Die OWRK-Methode lieferte eine brauchbare Näherung für diese Experimente.

Mit Glycerin und Ethylenglykol als Referenzflüssigkeiten lagen die Oberflächenspannungen in einer anderen Größenordnung. Möglicherweise führten die ähnlichen Eigenschaften der Substanzen zu einer schlechteren Näherung.

Für unbehandeltes Silizium ergab sich eine geringere Oberflächenspannung als für die plasmabehandelten Proben. Eine mögliche Erklärung könnte die reinigende Wirkung des Plasmas sein, denn Schmutzbeläge oder -partikel können die Spannung herabsetzen. Andererseits könnte die ätzende Wirkung des Teflons die Rauigkeit des Substrates erhöhen und damit die Oberfläche vergrößern.

Mit den hergestellten Polymeren (mit HMDI vernetztes PEG) konnten keine Kontaktwinkelmessungen durchgeführt werden. Die erhaltenen Folien besaßen so ungleichmäßige Oberflächen, daß die Abweichungen des gemessenen Kontaktwinkels einer Probe größer waren als der Einfluß der Oberflächenenergie. Ein weiteres Problem stellen die Polymere an sich dar. Da diese mit Wasser quellen, kann Wasser nicht als Prüfsubstanz eingesetzt werden. Hydrophobe Lösungsmittel zeigen hingegen kaum Unterschiede in ihrem Benetzungsverhalten, so daß, ähnlich wie beim System Glycerin und Ethylenglykol als Referenzflüssigkeiten, nur geringe Unterschiede bei den Kontaktwinkeln auftreten. Diese Unterschiede bei den Kontaktwinkeln sind zu gering, um eine Auswertung über das geometrische Mittel von polarem und dispersem Anteil der Grenzflächenspannung zu erlauben.

Eine exakte Quantifizierung der Porengröße konnte im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

4.9 Verfahrenstechnische Ergebnisse

Die unterschiedlichen, wasserlöslichen Polymere können mit den käuflichen und gut bekannten Vernetzern, insbesondere den niedermolekularen, divalenten Verbindungen, vernetzt werden. Das Problem liegt in der Formgebung der Ausbildung der Polymerüberstruktur, die die eigentliche, biomedizinische Anwendung erst möglich macht. Die unter dem Begriff zero-length cross-linker bekannten Reagenzien führen auch zu vernetzten Strukturen, allerdings konnten nicht so

langzeitstabile Materialien hergestellt werden, wie im Fall der niedermolekularen, bifunktionellen Verbindungen.

So entsteht bei der Reaktion eines beliebigen Präpolymers mit einem geeigneten Vernetzer eine feste Masse im Reaktor, die im besten Fall als disperser Feststoff, im ungünstigen Fall als „Klumpen“ anfällt, der nicht oder nur mit Mühe umgeformt werden kann.

Ziel und Aufgabe war aber die Entwicklung eines biokompatiblen Polymers, und allein die Frage, ob eine Biokompatibilität gegeben ist, macht Zellkulturtests und damit geeignete Folien nötig. Als drug-release System ist darüber hinaus eine Formgebung nötig, die das Ganze implantierbar macht.

4.9.1 Möglichkeiten der Vernetzung unter Ausbildung gewünschter Überstrukturen

Zellcontainer konnten mit dem im experimentellen Teil beschriebenen Verfahren recht simpel hergestellt werden. Hier eignete sich die Methode, bei der ein Träger benetzt und dann beschichtet wurde, ebenso wie das Hülse-Kern-Verfahren.

Bei der Beschichtung von Koronarstents wurde ein Tauchverfahren eingesetzt, mit dem leicht gecoverte Stents herstellbar waren. Ein Beispiel für einen gecoverten Stent ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

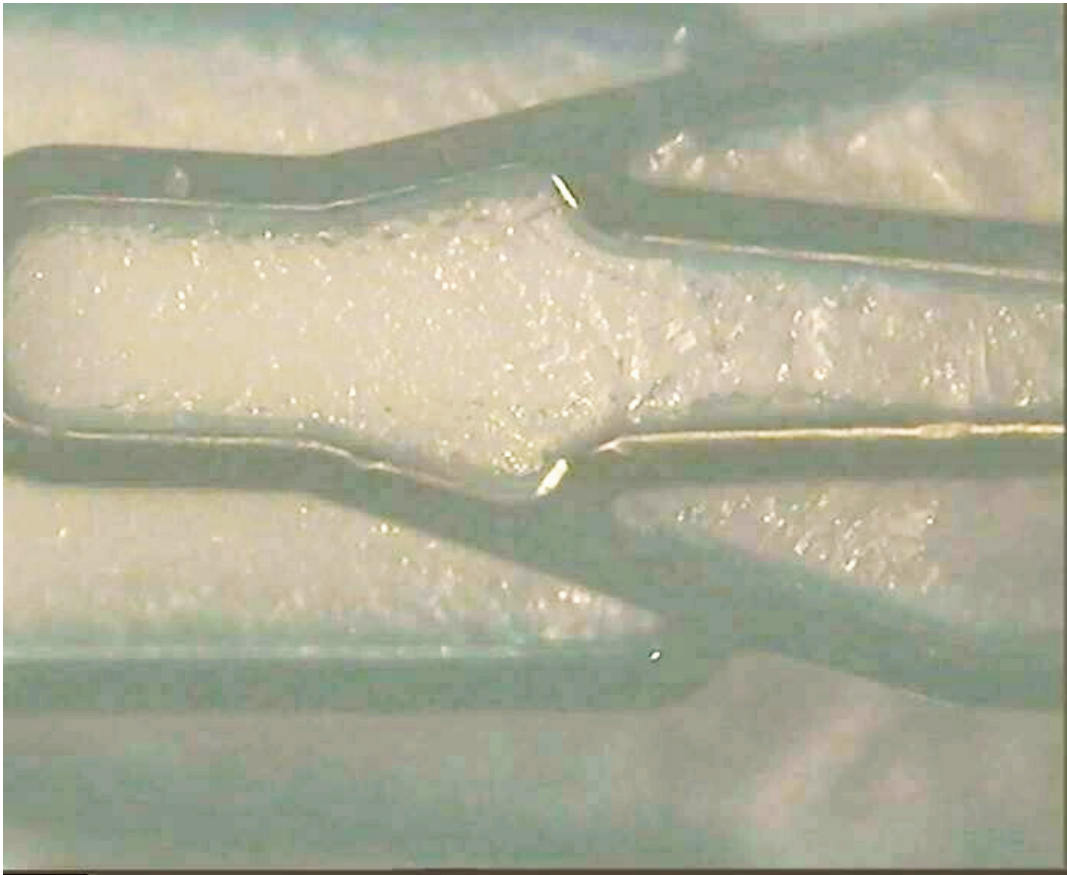


Abbildung 4-41: Aufnahme eines vollständig gecoverten Stents mit vernetzter HA

Um Stents lediglich zu coat, mußte in sehr verdünnter Lösung (0,2 %ig) unter Salzzugaben (0,1 M NaCl) gearbeitet werden, um die Viskosität der Lösung gering zu halten. Trotzdem wurden oft „Schwimmhäute“ beobachtet, die sich zwischen den „Struds“ bildeten. Erst die Einführung einer sehr hydrophilen Oberfläche, hergestellt durch das Plasmapolymersationsverfahren, führte zu besseren Ergebnissen.

Das folgende Bild zeigt das typische Auftreten von „Schwimmhäuten“.

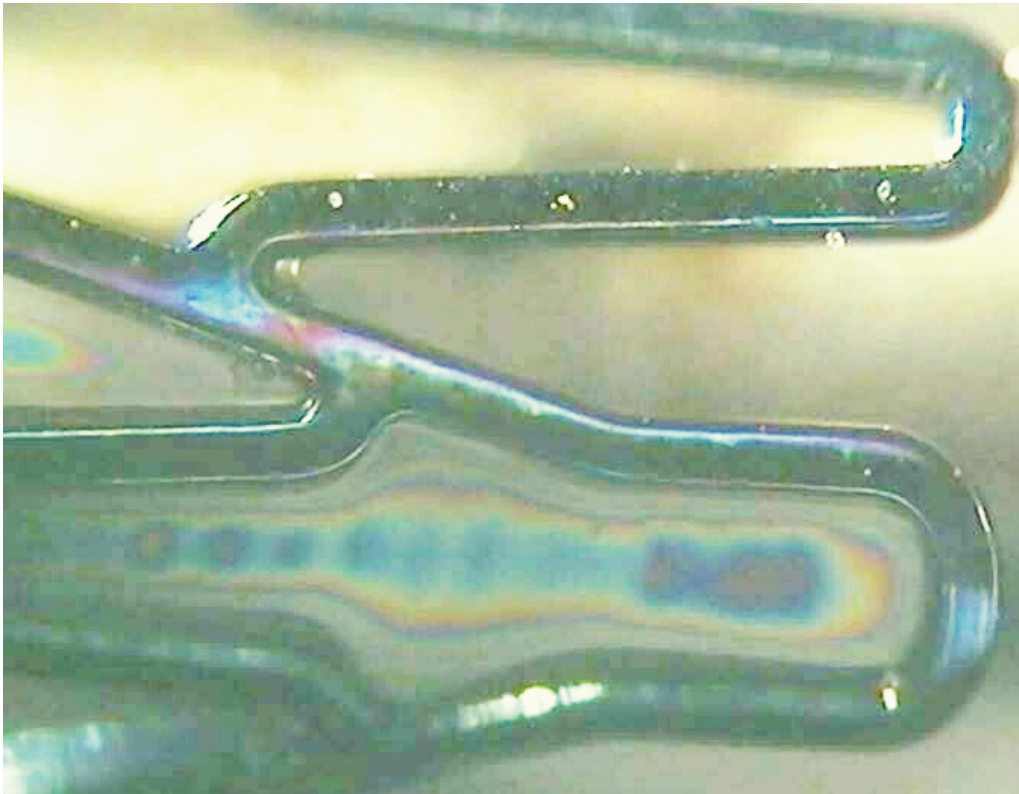


Abbildung 4-42: „Schwimmhäute“ eines gecoateten Koronarstents

Die besten Ergebnisse wurden bei Tauchversuchen und anschließendem Abblasen der Reste durch Preßluft erreicht. Ein Beispiel dafür ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

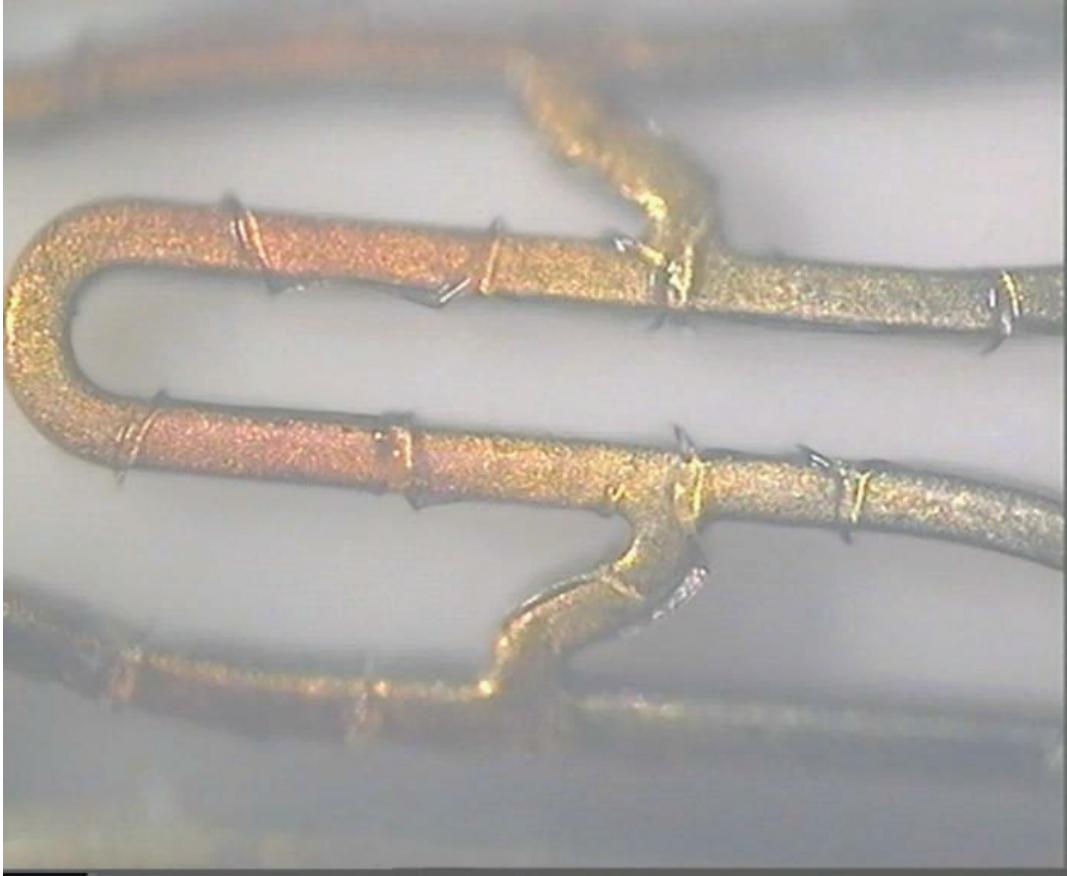


Abbildung 4-43: Zuvor unbehandelter Stent nach dem Tauchverfahren

Dieses Bild zeigt einen tauchbeschichteten Stent, dessen Oberfläche aber nicht durch das Plasmaverfahren hydrophilisiert wurde. Es sind bei der mit Epichlorhydrin vernetzten Lösung (0,25 %) kaum „Schwimmhäute“ zu sehen, allerdings trennt sich das Hydrogel auf der Oberfläche und klumpt sich zusammen.

Bei Verwendung einer hydrophilisierten Oberfläche sieht das Benetzungsverhalten besser aus, wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist.

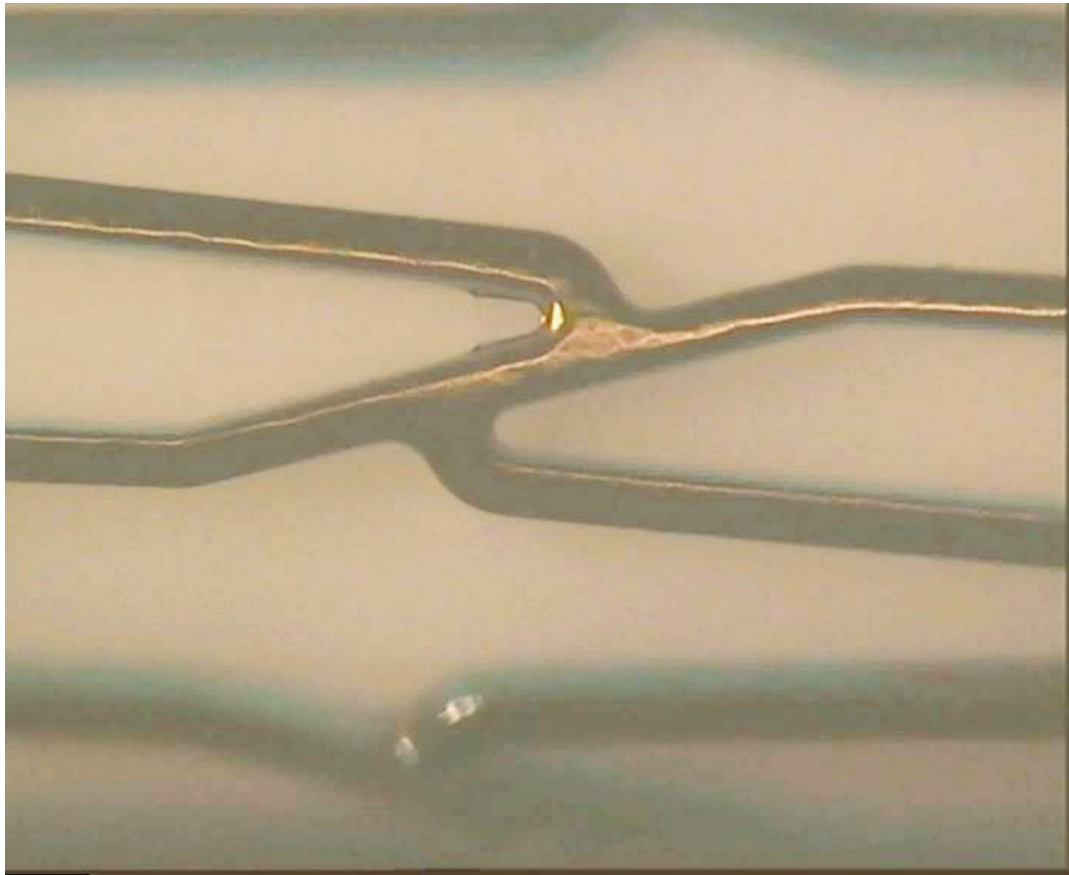


Abbildung 4-44: Zuvor hydrophilisierter Stent nach dem Tauchverfahren

Durch die Anpassung der Oberflächen (Grenzflächenenergie) kann eine Beschichtung realisiert werden. Dabei stellt die Kontaktwinkelmessung ein Verfahren zur Überprüfung der Vorbehandlung dar. Bei der Beschichtung einer Oberfläche mit einem Hydrogel wie der Hyaluronsäure ist ein Kontaktwinkel von Wasser $<40^\circ$ nötig, um eine homogene Beschichtung zu erhalten.

Durch eine Vorbehandlung der Oberfläche lassen sich nicht nur Verklebungen und Schwimmhäute vermeiden, sondern auch die Hafteigenschaften verbessern.

Bei den Untersuchungen zur Haftverbesserung von HA auf α :Si-C hat das Aminosilan, wie in Kap.: 2.3.3 beschrieben, die besten Ergebnisse gezeigt.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war es, biokompatible Materialien für medizintechnische Anwendungen zu entwickeln. Dabei sollten mit den entwickelten Materialien zum Einen Oberflächen beschichtet werden, um als alloplastische Gefäßwandstütze z.B. als koronar Stent eingesetzt werden zu können. Zum Anderen sollte ein Material entwickelt werden, das als Polymercontainer in der Lage ist Zellen aufzunehmen.

Das Erreichen des ersten Ziels wurde durch in-vitro Tests bestätigt. Das mit HA beschichtete Material sollte auch im Körper gut einheilen. Ein toxischer Effekt wurde nicht beobachtet. Für die Anwendung im koronaren Bereich, der Beschichtung von Stents, konnte über die Herstellung des polymeren Werkstoffs eine pharmakologische Eigenwirkung der polymeren Matrix erreicht werden. So war bei den Zellkulturtests signifikant sichtbar, daß Endothelzellen weder in ihrer Vitalität noch in ihrer Proliferation eingeschränkt wurden.

Darüber hinaus wurde die Proliferation von glatten Muskelzellen behindert. Die Proliferation von glatten Muskelzellen ist der Hauptgrund für die unerwünschte In-Stent-Restenose, die durch die Beschichtung und den dann möglichen Wirkstoffeinbau verhindert werden soll. Anders als bei anderen Systemen mit Wirkstoffdepot braucht der Wirkstoff nicht überdosiert zu werden, um die oft nachteiligen Begleiterscheinungen (Nebenwirkungen) des Arzneimittelträgers auszugleichen. Im Gegenteil, der Wirkstoffträger verhält sich nicht nur inert, wie in einem günstigen Fall, sondern unterstützt die Wirkung des Pharmakons.

Hyaluronsäure konnte in eine wasserunlösliche Form überführt werden, insbesondere auch auf komplizierten Formen wie den benutzen Stents. So konnte gezeigt werden, daß Hyaluronsäure durch ein Tauchverfahren auf einem Substrat abgeschieden werden kann. Die Vernetzung geschieht dann in einem Hyaluronsäure-Fällungsmittel, um die Ablösung der Beschichtung zu verhindern.

Die Haftung des Hydrogels auf einer metallischen Oberfläche konnte durch geeignete Manipulation der Oberflächeneigenschaften bzw. -struktur erreicht werden. So wurden unterschiedliche Verfahren entwickelt, die die Oberfläche

aktivieren bzw. auch funktionalisieren. Die Oberflächenrauigkeit kann durch das Plasmaverfahren in einem gewünschten Bereich eingestellt werden. Außerdem können chemisch reaktive Gruppen auf der Oberfläche gebunden werden, die dann zu kovalenten Bindungen zur Beschichtung befähigt sind.

Die Oberfläche kann neben der Rauigkeit auch in ihren Grenzflächenenergien eingestellt werden, so daß Tauchbeschichtungen von hydrophilen und auch hydrophoben Substanzen homogene Schichten ergeben.

Mit Blick auf das zweite Ziel konnten bekannte und häufig eingesetzte Hydrogele, wie das Alginat, durch eine polymeranaloge Umsetzung nachträglich funktionalisiert und vernetzt werden. Dadurch eröffnen sich in Gegenwart hoher Na^+ -Ionenkonzentrationen neue Anwendungsmöglichkeiten.

Mit einfachsten Laborhilfsmitteln konnten Alginat- und Chitosan-Kugeln im Größenordnungsbereich von 1 mm bis 10 mm hergestellt werden. Kapseln aus dem gleichen Material konnten in den Größen von 3 mm bis 10 mm erzeugt werden. Schläuche waren im Längenbereich von 5 mm bis 50 mm und mit 3 mm bis 7 mm Durchmesser herstellbar.

Mit Hilfe der thermischen Analyse, der DSC, sind Porengrößenverteilungen des gequollenen Materials durch Einsatz der Thermoporosimetrie meßbar, was den Einsatz für die Qualitätskontrolle polymerer Werkstoffe ermöglicht. So kann neben der Anzahl der Poren auch über ihre Größenverteilung eine Aussage gemacht werden, was für medizinische Anwendungen entscheidend ist.

Die Entwicklung der Stentbeschichtung mit HA wurde mit dieser Arbeit so weit vorangetrieben, daß ein fertiges System für den klinischen Einsatz zur Verfügung steht. So wird das Schichtsystem Stent, Haftvermittler und mit Glutaraldehyd vernetzte Hyaluronsäure im Tiermodell (Minipig) für 4 Wochen getestet. Für den humanen Einsatz sind noch Verbesserungen zu dieser Pilotbeschichtung nötig. Es hat sich gezeigt, daß das Tauchverfahren unzureichende Ergebnisse liefert. Die so erhaltenen Hyaluronsäureschichten waren ungleichmäßig dick und wiesen vereinzelt die unerwünschten „Schwimmhäutchen“ auf. Erfolg verspricht hier ein Airbrush-Verfahren, was sich problemlos in den Beschichtungsprozeß eingliedern läßt.

Die erhaltenen Methodengrundlagen und Herangehensweisen können für ähnlich gelagerte Fragestellungen übernommen werden. So könnte in einem weiteren Schritt

ein neues Material, unabhängig vom verwendeten Polysaccharid, auf seine Eignung untersucht werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Polypeptide, die ähnlich wie das Polysaccharid Hyaluronsäure im Körper abgebaut werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zu Oberflächenmodifikation sind nicht auf die koronare Anwendung beschränkt. Mit den entwickelten Methoden können bei Verwendung der Plasmatechnik Oberflächen nahezu unabhängig vom Trägermaterial funktionalisiert werden. Mit Hilfe der chemischen Verfahren unter Verwendung der Amino- oder Epoxisilane lassen sich gezielt metallische Oberflächen funktionalisieren.

Ein Meilenstein der vorliegenden Arbeit ist, daß sich das Benetzungsverhalten von Oberflächen mit Hilfe der Plasmapolymerisation und einer entsprechenden plasmatechnischen Nachbehandlung gezielt in einem weiten Bereich einstellen läßt. So konnte eine Oberfläche aus amorphem Siliziumcarbid extrem hydrophob eingestellt werden, so daß ein Kontaktwinkel mit Wasser von $>90^\circ$ beobachtet wurde. Wasser bildet mit amorphem Siliziumcarbid (unbehandelt) Kontaktwinkel von ca. 60° . Mit einem anderen Precursor und durch eine Nachbehandlung konnte das Benetzungsverhalten grundsätzlich verändert werden. Nun konnte in einigen Fällen kein Kontaktwinkel mehr bestimmt werden, da sich der Wassertropfen sofort auf der Oberfläche aufspaltete. Bei der Nachbehandlung handelte es sich um eine Sauerstoff-Plasmabehandlung von kurzer Dauer und geringer Leistung.

Die beschriebenen Systeme aus mit Isocyanat vernetztem Polyethylenglykol dienten als kostengünstiges Modellsysteme, an denen prinzipielle Methoden, wie die Thermoporosimetrie, entwickelt wurden. Im Unterschied zu der Hyaluronsäure ist bei dem PEG-Material keine pharmakologische Eigenwirkung zu erwarten. Unter dem Gesichtspunkt der Formstabilität (Quellungsvermögen) sind die PEG-Systeme den HA-Systemen überlegen. Nachteilig unter dem Gesichtspunkt der Biokompatibilität sind die Abbauprodukte der Urethane, die im Verdacht stehen cancerogen zu wirken, so daß der generelle Einsatz von Urethanen bei Langzeitimplantaten hinterfragt werden muß.

6 Literatur

- [AKATSUKA93] Akatsuka M., Yamamoto Y., Tobetto K., Yasui K., Ando T.; Supressive effects of hyaluronic acid on elastase release from rat peritonel leucocytes. *J Pharm Pharmacol*, 45: 110-114, 1993
- [BABAPULLE02a] Babapulle M.N., Eisenberg M.J., Coated Stents for the Prevention of Restenosis. Part I, *Circulation*, 106: 2734-2740, 2002
- [BABAPULLE02b] Babapulle M.N., Eisenberg M.J., Coated Stents for the Prevention of Restenosis: Part II, *Circulation*, 106: 2859-2866, 2002
- [BENZINA96] Benzina, Abderazak; Kruft, Marc-Anton B.; van der Veen, Frederik H.; Bär, Frits H.M.W.; Blezer, Ron; Lindhout, Theo; Koole, Leo H.: A versatile three-iodine molecular building block leading to new radiopaque polymeric biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 32, 1996
- [BUCHHOLZ97] Buchholz K.; *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*, VCH-Verlag, Weinheim-New York-Basel-Cambridge, 1997
- [CAMPOCCIA98] Campoccia, A. Davide; Doherty, Patrick; Radice, Marco; Brun, Paola; Abatangelo, Giovanni; Williams, David F.: Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials* 19, 1998
- [CHUPA00] Chupa J.M., Foster A.M, Sumner S.R., et al., Vascular cell response to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials*, 21: 2315-2322, 2000
- [DENUZIERE98] Denuziere, Anne; Ferrier, Danielle; Damour, Odile; Domard, Alain: Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials* 19: 1998
- [DESAI93] Desai, Manj C.; Stephens Stramiello, Linda M.: Polymer

- Bound EDC (P-EDC): A convenient reagent for formation of an amide bond. *Tetrahedron Letters*, Vol. 34: No. 48, 1993
- [DESCHERDER95] De Scheerder IK, Wilczek KL, Verbeken EV, et al., Biocompatibility of polymer-coated oversized metallic stents implanted in normal porcine coronary arteries. *Atherosclerosis*, 114: 105–114, 1995
- [DROBNIK91] Drobnik J.; Hyaluronan in drug delivery. *Adv Drug Del Rev*, 7: 295-308 1991
- [ELENDER96] Elender, G.; Kühner, M.; Sackmann, E.; Functionalisation of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers. *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 11: No. 6/7, 1996
- [Faivre99] Faivre C., Bellet T., Dolino G.; *Eur. Phys. J.* B7:19-36, 1999
- [FISCHMAN94] Fischman, D. L., Leon M.B., Baim D.S.; A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease (STRESS-Trial). *New Engl J Med*, 331: 496 – 501, 1994
- [FORRESTER91] Forrester J. S., Fishbein M., Helfant R.; A paradigm for restenosis based on cell biology: Clues on the development of a new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol*, 17: 758 – 769, 1991
- [GILL00] Gill, Iqbal; Ballesteros, Antonio: *Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals*; in: TIBTECH, Vol. 18, 2000
- [Groboillot94] Groboillot A., Boadi D.K., Poncelet D., Neufeld R.J.; Immobilization of Cells for Application in the Food Industry. *Critical Rev. Biotech.*, 14(2):75-107, 1994
- [GUERIN02] Guerin, Daniel C.; Hinshelwood, David D.; Monolache, Sorin; Denes, Ferencz S.; Shamamian, Vasgen A.: Plasma Polymerization of Thin Films: Correlations between Plasma Chemistry and Thin Film Character. *Langmuir*, Vol. 18: No. 10, 2002

- [HEUBLEIN98] Heublein B., Ozbek C., Pethig K., Silicon carbide-coated stents: clinical experience in coronary lesions with increased thrombotic risk. *J Endovasc Surg*, 5: 32–41, 1998
- [HOFMANN96] Hofmann, R., Mintz G.S., Dussaillant G.R.; Patterns and Mechanisms of In-Stent Restenosis: A Serial Intravascular Ultrasound Study. *Circulation* 94: 1247 – 1254, 1996,
- [HOLST79] Holst, Arno: Quellfähige Kohlenhydratderivate, deren Eigenschaften und Anwendungen. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 76/77: (Nr.1131), 1979
- [Höhne03] Höhne G.W.H., Hemminger W., Flammersheim H-J.; *Differential Scanning Calorimetry*: Springer 2nd edition, 2003
- [IZA00] Iza, M.; Woerly, S.; Danumah, C.; Kaliaguine, S.; Bousmina, M.; Determination of pore size distribution for mesoporous materials and polymeric gels by means of DSC measurements: thermoporometry. *Polymer*, 41:, 2000
- [JAYAKRISHNAN96] Jayakrishnan, A.; Jameela, S.R.; Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*, Vol. 17: No. 5, 1996
- [Klein86] Klein J., Vorlop K.D.; *Immobilization Techniques-Cells*, *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, M.Moo-Young (Hrsg.), Pergamon Press, Oxford, 203-224, 1986
- [Klein88] Klein J.; Polymers as matrices for whole cell immobilization. *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, 19, 93-105, 1988
- [KRASEMANN00] Krasemann L., Tieke B.; Highly Efficient Composite Membranes for Ethanol-Water Pervaporation. *Chem. Eng. Technol.* 23: 2000
- [KUZUYA01] Kuzuya, Masayuki; Kondo, Shin-Ichi; Sasai, Yasushi: Plasma Techniques for Preparation of Controlled Drug Release System. *Plasmas and Polymers*, Vol. 6: No. 3, 2001
- [LAHANN01] Lahann, Joerg; Klee, Doris; Pluester, Wilhelm; Hoecker, Hartwig: Bioactive immobilization of r-hirudin on CVD-coated metallic implant devices. *Biomaterials* 22: 2001

- [LAPCIK98] Lapcik L. Jr., Lapcik L., De Smedt S., Demesster J.; Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*, 98: 2663-2684, 1998
- [LAPČÍK98] Lapčík, Lubomir Jr.; Lapčík, Lubomir; De Smedt, Stefaan; Demeester, Joseph; Chabreček, Peter. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties and Applications; in: *Chemical Reviews*, Vol. 98: No. 8, 1998
- [LAPPAN01] Lappan, Uwe; Nitschke, Mirko; Pleul, Dieter; Simon, Frank; Uhlmann, Steffi: Polyelektrolyte Adsorption on NH₃-Plasma-Treated Poly(tetrafluoroethylene-co-hexafluoropropylene); in: *Plasmas and Polymers*, Vol. 6: No. 4, 2001
- [LAURENT92] Laurent, Torvard C.; Fraser, J. Robert E.: Hyaluronan. *The FASEB Journal*, Vol 6: 1992
- [LEE96] Lee, J.M.; Edwards, H.H.L.; Pereira, C.A.; Samii, S.I.; Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 7: 1996
- [LEE99] Lee, Moon Yeun; Cha, Soon Young; Park, Won Ho: Crosslinking of microbial copolyesters with pendant epoxide groups by diamine. *Polymer* 40: 1999
- [LEWIS02] Lewis A.L., Tolhurst L.A., Stratford P.W., Analysis of a phosphorylcholine-based polymer curing on a coronary stent pre- and post-implantation. *Biomaterials*, 23: 1697-1706, 2002
- [LUO00] Luo, Yi; Kirker, Kelly R.; Prestwich, Glenn D.: Cross-linked hyaluronic acidhydrogel films:new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 69: 2000
- [LUO01] Luo, Yi; Prestwich, Glenn D.: Hyaluronic Acid-N-hydroxysuccinimide: A Useful Intermediate for Bioconjugation. *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 12: No 6, 2001
- [MASON00] Mason, Mitchell; Vercruysse, Koen P.; Kirker, Kelly R.; Frisch, Ryon; Marecak, Dale M.; Prestwich, Glenn D.; Pitt,

- William G.: Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene and polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 21: 2000
- [MIYAZAKI98] Miyazaki, T.; Yomota, C.; Okada, S.: Degradation of hyaluronic acid at the metal surface. *Colloid & Polymer Science*, Vol. 276: No. 5, 1998
- [MONNINK99] Monnink S.H., van Boven A.J., Peels H.O.; Silicon-carbide coated coronary stents have low platelet and leukocyte adhesion during platelet activation. *J Investig Med*, 47: 304–310, 1999
- [MORIYAMA99] Moriyama, Kazuteru; Ooya, Tooru; Yui, Nobuhiko: Hyaluronic acid grafted with poly(ethylene glycol) as a novel peptide formulation. *Journal of Controlled Release* 59: 1999
- [MÜLLER00] Müller, Rolf-Joachim: Biologisch abbaubare Kunststoffe. *Biologie in unserer Zeit*, 31: Nr. 4, 2000
- [OERTHER99] Oerther S., Le Gall H., Payan E., Lapique F., Presle N., Hubert P., Dexheimer J., Netter P., Lapique F.; Hyaluronate-Alginate Gel as a Novel Biomaterial: Mechanical Properties and Formation Mechanism. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 63: No. 2, 1999
- [OKAY00] Okay, O.; Macroporous copolymer networks. *Progress in Polymer Science* 25: 2000
- [PAPAKONSTANTINO98] Papakonstantinou E., Karakiulakis G., Eickelberg O., Perruchoud A.P., Block L.H., Roth M.; A 340 kDa hyaluronic acid secreted by human vascular smooth muscle cells regulates their proliferation and migration, *Glycobiology* 8: 821-830, 1998
- [PARK98] Park, H.Y.; You, J.O.; Park, S.B.; Kim, J.H.; Kim, W.S.: pH-sensitive membrane using TEOS-chitosan hybrid IPN. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 25: 1998
- [POUYANI94] Pouyani, Tara; Prestwich, Glenn D.: Functionalized Derivates of Hyaluronic Acid Oligosaccharides: Drug Carriers and Novel Biomaterials. *Bioconjugate Chemistry*,

- Vol. 5: No. 4, 1994
- [PRESTWICH98] Prestwich, Glenn D.; Marecak, Dale M.; Marecek, James F.; Vercruysse, Koen P.; Ziebell, Michael R.: *Journal of Controlled Release* 53: 1998
- [PRUCKER99] Prucker O., Naumann Ch.A., R  he J., Knoll W., Frank, Curtis W.: Photochemical Attachment of Polymer Films to Solid Surfaces via Monolayers of Benzophenone Derivates. *J. American Chemical Society*, Vol. 121: No. 38, 1999
- [PRUCKER99] Prucker, Oswald; Naumann, Christoph A.; R  he, J  rgen; Knoll, Wolfgang; Frank, Curtis W.: Photochemical Attachment of Polymer Films to Solid Surfaces via Monolayers of Benzophenone Derivates. *J. American Chemical Society*, 1999
- [REH  KOV  97] Reh  kov  , Milena; Bako  , Du  an; Viz  rov  , Katarina; Sold  n, Maro  ; Jur   kov  : Properties of collagen and hyaluronic acid composite materials and their modification by chemical crosslinkin. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 30:, 1996
- [ROSE00] Rose, Thomas; Neumann, Burt; Thielking, Heiko; Koch, Wolfgang; Vorlop, Klaus-Dieter: Hohlkugeln aus Sulfoethylcellulose (SEC) auf Basis von Polyelektrolyt-Komplexen; in: *Chemie Ingenieur Technik* 72:, 2000
- [RZANY00] Rzany A., Harder C, Schaldach M., Silicon carbide as an anti-thrombogenic stent coating: An example of a science-based development strategy, *Prog Biomed Res.*, 3: 168 – 178, 2000
- [SCHWARTZ92] Schwartz, R.S., Huber K.C., Murphy J.G., et al., Restenosis and proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model, *J Am Coll Cardiol*, 19: 267 – 274, 1992
- [SENEL98] Senel, S.; Ikinci, G.; Kas, S.; Yousefi-Rad, A.; Hincal, A.A.: Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oramucosal delivery; in: *Proceed. Int. Symp. Control. Rel.*

- Bioact. Mater. 25 (1998)
- [SERRUYS94] Serruys, P. W. de Jaegere P., Ferdinand Kiemeneij F., et al., A comparison of balloon-expandable-stent with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease (BENESTENT-Trial), *New Engl J Med*, 331: 489 – 495, 1994
- [SHAFER00] Shafer D. E., Toll B., Schuman R., Nelson B.L., Mond J.J., Lees A.; Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selevtive crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides. *Vaccine* 18: 2000
- [SHERMAN94] Sherman L., Sleeman J., Herrlich R. et al., Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology*, 6: 726-733, 1994
- [SHU02] Shu X.Z., Liu Y., Luo Y., Meredith C., Prestwich G.D.; Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels. *Biomacromolecules*, 3: 1304-1311, 2002
- [SHU03] Shu X.Z., Liu Y., Palumbo F., Prestwich G.D.; Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. *Biomaterials*, 24: 3825-3834, 2003
- [ŠIMKOVIC00] Šimkovic, I.; Hricovíni, M.; Šoltés, L.; Mendichi, R.; Cosentino, C.: Preparation of water-soluble/insoluble derivates of hyaluronic acid by cross-linking with epichlorhydrin in aqueous NaOH/NH₄OH solution. *Carbohydrate Polymers* 41: 2000
- [SMEDS01A] Smeds K. A.; Grinstaff M.W.; Photocrosslinkable polysaccharides for *in situ* hydrogel formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 54:, 2001
- [SMEDS01b] Smeds, Kimberly A.; Grinstaff, Mark W.: Photocrosslinkable

- polysaccharides for *in situ* hydrogel formation; in: Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 54, 2001
- [SMEDS99] Smeds, Kimberly A.; Pfister-Serres, Anne; Hatchell, Diane L.; Grinstaff, Mark W.: Synthesis of a novel polysaccharide hydrogel. *J.M.S.-Pure Appl. Chemistry*, A36:(7&8), 1999
- [SOUSA03a] Sousa J.E., Serruys P.W., Costa M.A., New Frontiers in Cardiology Drug-Eluting Stents: Part I, *Circulation*, 107: 2274-2279, 2003
- [SOUSA03b] Sousa J.E., Serruys P.W., Costa M.A., New Frontiers in Cardiology Drug-Eluting Stents: Part II, *Circulation*, 107: 2383-2389, 2003
- [Spiekerman90] Spiekerman P.; *Methodische Untersuchung zur Verkapselung von tierischen Zellkulturen und ihrer Einsatzmöglichkeiten*, Dissertation Braunschweig. 1990
- [STRAUSS91] Strauss, B. H, Serruys P.W., de Scheerder I.K.; Relative risk analysis of angiographic predictors of restenosis within the coronary wallstent. *Circulation*, 84: 1636-1643, 1991
- [SUZUKI93] Suzuki Y., Yamaguchi T., Effects of hyaluronic acid on macrophage phagocytosis and active oxygen release, *Agents Actions*, 38: 32-37, 1993
- [TOMIHATA97] Tomihata, Kenji; Ikada, Yoshito: Preparation of cross linked hyaluronic acid films of low water content. *Biomaterials*, Vol. 18: No. 3, 1997
- [TOMIHATA97a] Tomihata, Kenji; Ikada, Yoshito: Crosslinking of Hyaluronic Acid with Glutaraldehyde. *Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 35: 1997
- [Tomihata97b] Tomihata K., Ikada Y.; Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide: *J. Biomed. Mater. Res.*, 37: 243-251, 1997
- [TRUDEL02] Trudel, J.; Massia, S.P.: Assessment of the cytotoxicity of photocrosslinked dextran and hyaluronan-based hydrogels to vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* 23: 2002
- [UHRICH97] Urich, Kathryn: Hyperbranched Polymers for Drug

- Delivery. *TRIP*, Vol. 5: No. 12, 1997
- [Vaidya04a] Vaidya A, Borck A., Fischer L.; – Rationally modified substrate selectivity of glucose oxidase generated through crosslinking of the imprinted protein (CLIP), in preparation.
- [Vaidya04b] Vaidya A, Borck A., Manns A., Fischer L.; Altering Glucose Oxidase to Oxidize D-Galactose through Crosslinking of Imprinted Protein. *ChemBioChem.*, 5: 132-135, 2004
- [VAN DER GIESSEN96] van der Giessen W.J., Lincoff A.M., Schwartz R.S.; Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries, *Circulation*, , 94: 1690–1697, 1996
- [VERCRUYSE98] Vercruysse K.P., Prestwich G.D.; Hyaluronate derivatives in drug delivery. *Crit-Rev-Ther-Drug-Carrier-Syst.*, 15: 513-55, 1998
- [VERHEYE00] Verheye St.; Markou Ch.P., Salame M.Y., Wan B., King Sp.B. III; Robinson K.A., Chronos N.A.F., Hanson St.R.; Reduced Thrombus Formation by Hyaluronic Acid Coating of Endovascular Devices. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2000
- [Vorlop84] Vorlop K.D.; *Entwicklung von Verfahren zur Polymerfixierung.*, Dissertation Braunschweig. 1984
- [YAZDANI-PEDRAM00] Yazdani-Pedram, Mehrdad; Retuert, Jaime; Quijada, Raul: Hydrogels based on modified chitosan. *Macromolecular Chemistry and Physics* 201: No. 9, 2000

LEBENS LAUF

Name: Alexander Gerhard Borck

Geburtsdatum: 18.06.1971

Geburtsort: Helmstedt

Schul Ausbildung:

1977 – Juli 1981	Grundschule Söplingen
1981 – Juni 1983	Orientierungsstufe Conringschule Helmstedt
1983 – Juni 1987	Lademann-Realschule Helmstedt
1987 – Mai 1990	Gymnasium am Bötschenberg Helmstedt

Wehrdienst:

Juli 1990 – Juni 1991	Flottenkommando Glücksburg
-----------------------	----------------------------

Studium:

Oktober 1991 – Juni 1999	Technische Universität Braunschweig mit dem Abschluß Diplom-Chemiker
--------------------------	---

Promotion:

Februar 2000 – Januar 2001	Medizinische Hochschule Hannover
Februar 2001 – Juni 2002	Franz-Patatz-Zentrum für Interdisziplinäre Polymerforschung, Braunschweig
Seit Juli 2002	BIOTRONIK GmbH & Co. KG, Erlangen

Veröffentlichungen:

Klein, J. Borck, A.; Polymere: vielseitige Materialien in der Medizin. Forschungsmagazin der Technischen Universität Braunschweig., 1: 90-95, 2002